

UNIVERSITE DU QUEBEC

Thèse
présentée à
l'Université du Québec à Trois-Rivières

Comme exigence partielle
au Doctorat en Biophysique

par

Agnès Lejeune

La déformabilité de la cellule cible:
un facteur déterminant du mode de phagocytose
d'*Entamoeba histolytica*, souche Laredo

Novembre 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*A Pierre ,
à mes deux petites amibes chéries
Sophie et Olivier*

*A mon père et
à ma mère*

*à vous tous ,
un grand merci
pour votre amour*

RESUME

Entamoeba histolytica est une des rares amibes capables de parasiter l'homme et dont certaines souches, très pathogènes, peuvent s'attaquer à toute une série d'organes de l'hôte. En raison du grand nombre de décès causés par l'amibe, de nombreuses études biochimiques portant sur son mécanisme d'attaque et de destruction des cellules ont été effectuées.

En utilisant le globule rouge comme cellule cible, nous avons étudié les aspects morphologiques, physiques et mécaniques de la phagocytose d'*Entamoeba histolytica*.

Dans la première partie de notre travail, l'étude morphologique en microscopie optique et électronique de la phagocytose d'érythrocytes nous montre qu'*Entamoeba histolytica* possède deux modes d'ingestion très différents. Le premier est une phagocytose classique au cours de laquelle l'amibe vient englober l'érythrocyte au complet ou tout au moins un très gros fragment, ce qui conduit à la formation de très grandes vacuoles digestives, peu nombreuses. Le deuxième mode d'ingestion est très particulier. L'amibe aspire le globule rouge par l'intermédiaire d'un long canal qui s'étire alors que son extrémité s'arrondit pour former une vésicule. Nous avons appelé ce mode de phagocytose qui conduit à la formation d'un grand nombre de petites vacuoles digestives, la microphagocytose.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons montré que le mode de phagocytose n'est pas lié à la présence dans notre culture de différentes sous populations d'amibes utilisant des mécanismes de phagocytose différents mais qu'il existe une corrélation entre la rigidité de la cellule cible et le type de phagocytose. En effet, en augmentant progressivement la rigidité des érythrocytes par des traitements à des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, on assiste à une augmentation des phagocytoses classiques et à une diminution des microphagocytoses.

Afin de montrer que la glutaraldéhyde ne bloque pas un récepteur membranaire qui déterminerait un type de phagocytose, nous avons fait deux expériences contrôles. Dans la première, nous avons donné aux amibes des mélanges de globules rouges traités à des concentrations différentes de glutaraldéhyde. Dans ce cas, on n'observe pas la sélection d'un type d'érythrocyte par *Entamoeba histolytica*. La deuxième expérience contrôle, a été faite à l'aide de "ghosts" qui n'ont pas d'hémoglobine et qui sont par conséquent peu rigides. Ces "ghosts", même traités à la glutaraldéhyde, ne sont ingérés que par microphagocytose. Ces résultats nous permettent de conclure que le type de phagocytose observé chez *Entamoeba histolytica* est déterminé par la déformabilité de l'érythrocyte.

Cette étude vient compléter les connaissances biochimiques déjà acquises sur le mécanisme d'attaque des cellules par l'amibe et montre en particulier que la rigidité de la cellule cible ne constitue pas un obstacle pour

Entamoeba histolytica. En effet lorsque les érythrocytes sont suffisamment déformables l'amibe les ingère par microphagocytose. D'autre part , lorsque la rigidité de ces érythrocytes dépasse un certain seuil, l'amibe ne peut plus les déformer et ils sont alors ingérés par phagocytose classique.

REMERCIEMENTS

Au Docteur Claude Gicquaud, un très grand merci de m'avoir acceptée dans son laboratoire puis de m'avoir soutenue tout au long de mon travail de recherche.

Je tiens également à remercier les personnes qui de près ou de loin m'ont aidée à mener à terme mon projet. Je mentionnerai ici le Docteur Pierre F. Leblond de l'hôpital St-Sacrement à Québec, qui m'a très aimablement prêté son système de filtration des globules rouges, le Docteur Michel Ringuet qui m'a prêté sa pompe à seringue, le personnel du Centre Hospitalier Cooke à Trois-Rivières et plus particulièrement Monsieur Yvon Lafrenière, chef technologiste des laboratoires qui m'a donné accès au Coulter-Counter et qui m'a fourni le sang nécessaire pour la poursuite de mon travail. Merci également à tous les donateurs de sang.

A tous les membres, professeurs et étudiants, du groupe de recherche en biotechnologie des membranes, un grand merci pour la merveilleuse ambiance d'amitié qu'ils font régner.

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Remerciements.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	ix
Chapitre 1: <u>Introduction</u>	1
1.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1.1. Phylogénie.....	1
1.1.2. Le cycle de vie d' <i>Entamoeba histolytica</i>	3
1.1.3. Les trophozoïtes	5
1.2. La phagocytose	9
1.2.1. Concept général.....	9
1.2.2. Mécanisme de la phagocytose chez <i>Entamoeba histolytica</i>	12
1.3. But du travail	19

Chapitre 2.	<u>Matériel et méthodes</u>	21
2.1.	Culture des amibes.....	21
2.2.	Préparation des globules rouges.....	21
2.3.	Préparation de "ghosts" ou "fantômes" d'érythrocytes chargés de carboxyfluorescéine	22
2.4.	Traitement des globules rouges et des "ghosts" à la glutaraldéhyde	22
2.5.	Etude en microscopie optique de la phagocytose de globules rouges.....	23
2.5.1.	Etude dynamique de l'interaction amibes-globules rouges.....	23
2.5.2.	Etude quantitative de l'interaction amibes-globules rouges.....	24
2.6.	Etude en microscopie électronique de la phagocytose de globules rouges par <i>Entamoeba histolytica</i>	28
2.7.	Caractérisation des globules rouges traités à la glutaraldéhyde	29
2.7.1.	Mesure de la déformabilité globale des globules rouges.....	29
2.7.1.1.	Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de filtration sur membranes de polycarbonate	29
2.7.1.2.	Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de détermination du microhématocrite.....	37

2.7.1.3. Mesure de la déformabilité des globules rouges au "Coulter-Counter"	40
2.8. Evaluation de la fluidité membranaire par mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH	42
Chapitre 3. <u>Résultats et discussion</u>	46
3.1. Etude morphologique de l'ingestion de globules rouges par <i>Entamoeba histolytica</i>	46
3.1.1. Mise en évidence de deux types de phagocytose en microscopie optique	46
3.1.2. Etude par microscopie électronique des deux types de phagocytose d'érythrocytes par <i>Entamoeba histolytica</i>	52
3.1.2.1. Microphagocytose	52
3.1.2.2. Phagocytose classique	58
3.1.2.3. Description des vacuoles digestives formées par les deux types de phagocytose	64
3.1.2.4. Phagocytose de type intermédiaire	67
3.1.2.5. Discussion de l'étude morphologique de la phagocytose de globules rouges par <i>Entamoeba histolytica</i>	68
3.2. Phagocytose de globules rouges rigidifiés à la glutaraldéhyde	75
3.3. Caractérisation des globules rouges	79
3.3.1. Mesure de la déformabilité globale des globules rouges	80
3.3.1.1. Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de filtration à travers des membranes de polycarbonate	80

3.3.1.2. Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de détermination du microhématocrite et le "Coulter-Counter"	84
3.3.1.3. Conclusion des mesures de déformabilité globale des globules rouges.....	93
3.3.2. Mesure de la fluidité de la fraction lipidique de la membrane des globules rouges par mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH.....	94
3.3.3. Conclusion sur la caractérisation des globules rouges traités à la glutaraldéhyde	97
3.4. La déformabilité du globule rouge est le facteur déterminant le mode de phagocytose	99
3.4.1. Phagocytose de mélanges de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde	99
3.4.2. Phagocytose de "ghosts" et d'érythrocytes traités à la glutaraldéhyde.....	105
3.4.3. Conclusion.....	110
Chapitre 4. <u>Discussion générale et conclusion</u>	111
Bibliographie	119

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Cycle de vie d' <i>Entamoeba histolytica</i>	4
Figure 2	Coupe dans un trophozoïte d' <i>Entamoeba histolytica</i> souche Laredo	6
Figure 3	Schéma des différents modes d'endocytose.....	10
Figure 4	Schéma hypothétique du mécanisme d'attaque par <i>Entamoeba histolytica</i>	15
Figure 5	Schéma du montage du système de filtration	30
Figure 6	Comportement d'un globule rouge dans un pore de la membrane	32
Figure 7	Exemple de courbe de filtration.....	36
Figure 8	Schéma illustrant le principe de la mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique du microhématocrite	38
Figure 9	Formation d'une rosette par l'adhésion de globules rouges à l'amibe	47
Figure 10	Comparaison en microscopie optique des deux mécanismes de phagocytose.....	48
Figure 11	Microphagocytose simultanée de quatre globules rouges	49
Figure 12	Clichés successifs d'une microphagocytose d'un "ghost" chargé de carboxyfluorescéine.....	50
Figure 13	Début de la microphagocytose.....	53
Figure 14	Ebauche du canal de microphagocytose.....	54
Figure 15	Elongation du canal de microphagocytose.....	55

Figure 16	Formation de la vésicule de microphagocytose	56
Figure 17	Coupe dans un canal de microphagocytose	57
Figure 18	Phagocytose classique	59
Figure 19	Déformation de l'érythrocyte lors de la phagocytose classique ..	60
Figure 20	Couche dense bordant la face interne d'un pseudopode de phagocytose englobant un érythrocyte lors de la phagocytose classique.....	61
Figure 21	Ingestion partielle d'un érythrocyte lors de la phagocytose classique.....	62
Figure 22	Vacuole formée lors de la phagocytose classique.....	65
Figure 23	Morphologie des vacuoles digestives.....	66
Figure 24	Phagocytose intermédiaire.....	69
Figure 25	Phagocytose intermédiaire d'un globule rouge ayant perdu une partie de son hémoglobine	70
Figure 26	Deux modes de phagocytose différents présents sur une même amibe, dont celle d'un érythrocyte ayant perdu une partie de son hémoglobine.....	72
Figure 27	Deux modes de phagocytose différents présents sur la même amibe	73
Figure 28	Moyenne des comptages des différents types de phagocytose en fonction de la concentration en glutaraldéhyde utilisée lors du traitement des globules rouges	76
Figure 29	Rapport du nombre de microphagocytoses/nombre de phagocytoses classiques en fonction de la concentration en glutaraldéhyde utilisée pour le traitement des globules rouges	78
Figure 30	Déformabilité des globules rouges mesurée par la technique de filtration	81

Figure 31	Mesure de la déformabilité des érythrocytes: détermination du nombre (Ni) de globules rouges présents par unité d'hématocrite.....	85
Figure 32	Mesure de la déformabilité des érythrocytes: détermination du coefficient (Cx)d'accroissement apparent du volume des globules rouges	86
Figure 33	Mesure de la déformabilité des érythrocytes: détermination du volume apparent des globules rouges.....	87
Figure 34	Mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans la membrane des globules rouges traités à la glutaraldéhyde...	96
Figure 35	Phagocytose de mélanges 1:1 de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde.....	101
Figure 36	Phagocytose d'érythrocytes traités à la glutaraldéhyde 0,050%.....	107
Figure 37	Phagocytose d'un "ghost" chargé de carboxyfluorescéine et traité à la glutaraldéhyde	108
Figure 38	Mécanisme d'ingestion de globules rouges par <i>Entamoeba histolytica</i>	115

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1. *Entamoeba histolytica*

1.1.1. Phylogénie

Entamoeba histolytica est un protozoaire formant des pseudopodes appartenant à la super classe des Rhizopodes, subphylum Sarkodina, classe Lobosa, ordre Amoeba. Parmi ceux-ci, elle appartient à la famille des Entamoebinae (Levine N.D. *et al* . 1980). On retrouve les membres du genre *Entamoeba* dans les eaux usées (i.e. *Entamoeba moskowski*) mais également chez divers hôtes: les poissons, les amphibiens, les reptiles (i.e. *Entamoeba invadens* Mc Connachie E.W. 1955) et les mammifères (i.e. *Entamoeba polecki* chez le porc).

Il existe huit espèces d'amibes qui parasitent l'homme. Ce sont: *Entamoeba histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. gingivalis*, *E. polecki*, *Endolimax nana*, *Dientamoeba fragilis* et *Iodamoeba butchlii* . Tous ces organismes, mise à part *E. gingivalis* qui est localisée au niveau de la bouche, peuvent être isolés des selles (Petri W.A. *et al* . 1989) . Parmi ces protozoaires entériques, qui sont pour la plupart non pathogènes, il faut distinguer *Entamoeba histolytica* , potentiellement très virulente. En effet c'est elle qui est responsable des amibiases.

Les estimations faites par Walsh (1986) suggèrent qu'en 1984 probablement 500 millions de personnes étaient infectées par *Entamoeba histolytica* et que parmi celles-ci, 38 millions ont présenté des symptômes plus ou moins graves d'amibiase (dysenterie, perforation de l'intestin, abcès du foie et lésions d'organes tels les poumons, les os et le cerveau). Cette année là , 40 000 à 100 000 décès ont été attribués à l'amibe, ce qui place l'amibiase en troisième position, après la malaria et la schistomiase comme source de décès dûs au parasitisme.

Toutes les souches d'*Entamoeba histolytica* n'ont pas le même degré de pathogénicité et de virulence (Sargeant P.G. *et al* . 1982, 1987). Cependant pour un clone, la virulence peut varier en fonction du temps de mise en culture, de la présence de divers composants présents dans le milieu et le passage dans un hôte. On peut ainsi avoir des souches non virulentes qui redeviennent virulentes et vice versa (Gitler C. *et al* . 1984, Martinez-Palomo A. 1988 a-b, Mc Laughlin J. 1985).

Plusieurs tentatives ont été faites pour essayer de corréler des propriétés physiques ou biochimiques des diverses souches avec leur virulence apparente, sans pour autant apporter une réponse univoque (Mc Laughlin J. *et al* . 1985, Gitler C. *et al* . 1985, Martinez-Palomo A. 1988 (a-b), Petri W., 1989). Cette variabilité d'expression du potentiel pathogène et la restriction des amibiases à certaines régions du globe sont là deux des aspects curieux de la biologie de l'amibe (Martinez-Palomo A. 1988 a-b) .

Parmi les souches d'*Entamoeba histolytica*, les souches Huff et Laredo, appelées "*Entamoeba histolytica-like* " occupent une place particulière. Bien qu'étant morphologiquement similaires aux autres souches, elles sont reconnues pour être non pathogènes, de se développer entre 10 et 35 °C contrairement aux autres souches qui ne poussent qu'aux environs de 35 °C. De plus, elles sont capables de croître dans des milieux fortement hypotoniques (Richards C.S. *et al.* 1966, Diamond L.S. 1968 (a-b). Sargeant P.G. *et al.*(1980) ont de plus montré que leurs patrons électrophorétiques d'isoenzymes sont différents de ceux des autres *Entamoeba histolytica* .

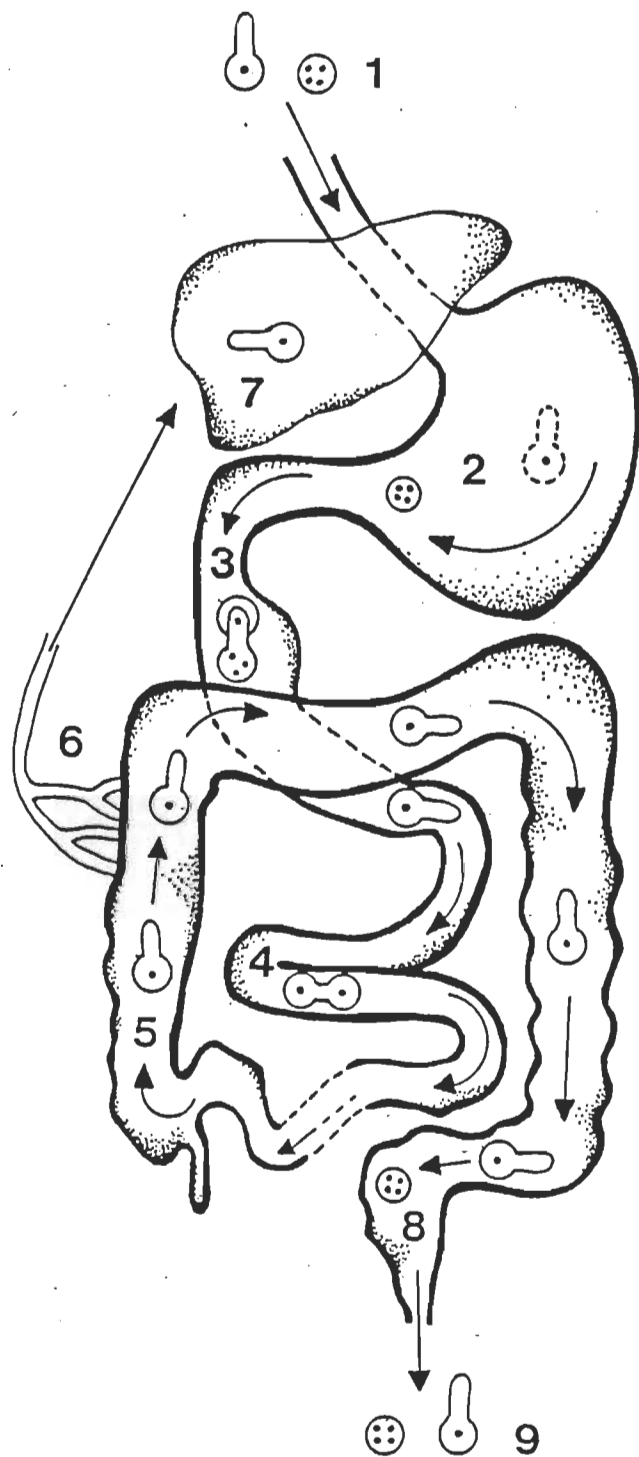
1.1.2. Le cycle de vie d'*Entamoeba histolytica*

Le cycle de vie de l'amibe est relativement simple (figure 1). Pour qu'il y ait infection, il faut qu'il y ait ingestion d'un kyste qui est résistant à l'acidité de l'estomac et qui peut survivre hors de l'hôte pendant plusieurs semaines dans un environnement humide (Brown H.W. 1969). Lorsque la barrière de l'estomac est franchie, la paroi protectrice du kyste disparaît. Les quatre noyaux du kyste se dupliquent pour former huit noyaux, et le cytoplasme se divise ensuite pour donner la forme motile de l'amibe, le trophozoïte. Ceux-ci se divisent activement et peuvent venir attaquer la muqueuse intestinale, perforer la paroi de l'intestin, et par la circulation sanguine venir coloniser le foie (abcès hépatique), les poumons, ainsi que d'autres organes.

Au niveau de l'intestin, lorsque certaines conditions favorables à

Figure 1: Cycle de vie d'*Entamoeba histolytica* :

- 1 - Ingestion de kystes et de trophozoïtes
- 2 - Destruction des trophozoïtes au niveau de l'estomac
- 3 - Dissolution de la coque du kyste sous l'action des sucs digestifs, et division du cytoplasme pour libérer la forme motile de l'amibe, le trophozoïte
- 4 - Division active des trophozoïtes
- 5 - Multiplication et colonisation de la muqueuse intestinale par les trophozoïtes et développement de lésions dans la muqueuse
- 6 - Les amibes peuvent pénétrer dans les vaisseaux sanguins et par le courant portal, être entraînés vers le foie ou d'autres organes
- 7 - Les amibes provoquent des abcès au foie
- 8 - Les kystes se forment au niveau du gros intestin
- 9 - Libération de kystes et de trophozoïtes avec les selles. Les trophozoïtes survivent une brève période, les kystes peuvent survivre plusieurs mois.



l'enkystement sont remplies, il y a formation, et libération de kystes avec les excréments. Ceux-ci, en contaminant l'eau et les aliments, vont à nouveau pouvoir être ingérés. Le kyste est le stade de l'amibe qui lui permet de se propager d'hôte à hôte et le trophozoïte, la forme virulente pathogène qui s'attaque aux tissus.

1.1.3. Les trophozoïtes.

Les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* ont un très grand pléomorphisme. Les amibes sont grandes (12-60 μm), généralement allongées, et ont une motilité unidirectionnelle. La surface peut présenter des lobopodes, des filopodes et un uroïde postérieur bien différencié (Martinez-Palomo A. 1982, 1988 b).

Les composants majeurs du cytoplasme de l'amibe sont un système vacuolaire principalement impliqué dans les processus d'endocytose, des grains de glycogène, des ribosomes, et le noyau. On ne retrouve pas la plupart des organites généralement présents chez les Eucaryotes: il n'y a pas de microtubules cytoplasmiques, pas de systèmes membranaires équivalents à l'appareil de Golgi ni de réticulum endoplasmique des Eucaryotes supérieurs. Il n'y a pas de mitochondries, ni de système de lysosomes primaires (Aley S.B. *et al* . 1984, McLaughlin J. *et al* . 1985, Martinez-Palomo A. 1982, 1986) (figure 2).

Figure 2: Coupe dans un trophozoïte d'*Entamoeba histolytica* souche Laredo

La matrice du cytoplasme est caractérisée par la présence d'un grand nombre de grains de glycogène fortement colorés au plomb. A l'intérieur du cytoplasme on distingue un grand nombre de vacuoles (**V**) dont certaines contiennent des fragments de globules rouges, d'autres des débris d'origines diverses. On aperçoit également le noyau (**N**) délimité par une double membrane. Sous la face interne de la membrane nucléaire on voit des amas de chromatine périphérique.

Barre = 1µm

Les ribosomes sont souvent groupés et forment des structures hélicoïdales de 300 nm de long et 40 nm de diamètre: les polysomes. La synthèse des protéines se ferait essentiellement à leur niveau. Dans les kystes, et plus rarement dans les trophozoïtes, les hélices peuvent s'agréger et ainsi former des cristaux de plusieurs micromètres de diamètre, nommés "chromotoid bodies" ou corps chromatoïdes.

Les "cylindrical bodies" ou corps cylindriques constituent un autre composant caractéristique du cytoplasme de l'amibe. Ils sont formés de 9 à 30 particules cylindriques mesurant chacune 250 nm de long et 90 nm de diamètre. En raison de leur similarité avec les rhabdovirus, Bird (1976) *et al* proposent que ces particules soient des rhabdovirus. Cependant aucune preuve expérimentale n'est venue corroborer cette hypothèse (Martinez-Palomo A., 1982, Lushbaugh W.B. *et al* . 1988).

Le noyau du trophozoïte mesure entre 4 et 7 μm de diamètre. La membrane nucléaire est percée de nombreux pores d'environ 50-65 nm de diamètre. Sous la face interne de la membrane se trouvent des amas irréguliers et discontinus de "chromatine périphérique" composés de particules denses. Cette "chromatine périphérique" est riche en ARN et serait l'équivalent du nucléole des Eucaryotes supérieurs. Le noyau contient des vacuoles intranucléaires très particulières. Elles ont de 0,1 à 0,3 μm de diamètre, sont situées en périphérie du noyau mais jamais en contact avec la membrane nucléaire. La fonction de ces vacuoles est inconnue.

Lors de la division cellulaire, en début de prophase, apparait dans le noyau, un granule dense. Il s'agit du MTOC (microtubules organizing center) autour duquel s'organisent les microtubules de l'appareil mitotique. Trente (30) chromosomes vont se condenser (Gicquaud C. 1979). Ces phénomènes ont été observés sur la souche Laredo et jamais chez les *Entamoeba histolytica* typiques (Lushbaugh W.B. *et al* . 1988).

Il faut également noter que le métabolisme d' *Entamoeba histolytica* est assez particulier. En effet, bien que dépourvue de mitochondrie, d'un cycle tricarboxylique, de protéines hémiques, et des chaînes de transporteurs d'électrons conventionnelles, l'amibe a malgré tout la capacité de respirer et de pousser en présence d'oxygène. D'autres aspects inusités de son métabolisme sont, la substitution de l'ATP par du pyrophosphate dans plusieurs réactions glycolytiques clés, l'absence de catalase, et des enzymes de transformation du glutathion (pour revue voir Reeves R.E. 1984).

Bien qu'*Entamoeba histolytica* soit un des Eucaryotes les plus primitifs, le trophozoïte est probablement une des cellules tueuses les plus efficaces (Gitler C. 1985). Cette capacité est liée à son très grand pouvoir de phagocytose et de cytolyse.

1.2. La phagocytose

1.2.1. Concept général

La phagocytose et la pinocytose sont deux fonctions qui permettent aux cellules d'Eucaryotes d'ingérer des substances présentes dans le milieu extérieur et qui ne peuvent y pénétrer par une autre voie (figure 3). Au cours de ces deux processus, il y a des déformations membranaires qui permettent d'englober la substance à ingérer ce qui aboutit à la formation de vacuoles nommées phagosomes dans le cas de la phagocytose, et pinosomes dans le cas de la pinocytose. Par la suite, les phagosomes et les pinosomes vont fusionner avec des lysosomes, et ainsi s'amorce la digestion de la proie.

Plusieurs distinctions sont à faire entre la pinocytose et la phagocytose (Mellman I. *et al* . 1986):

i) Généralement on parle de phagocytose lors de l'ingestion de grosses particules (débris de cellules, ou même de cellules entières), et on parle de pinocytose lorsqu'il y a ingestion de fluide ou de particules solubles en suspension dans le milieu.

ii) Alors que la pinocytose est une propriété de pratiquement toutes les cellules d'Eucaryotes, seules certaines cellules hautement spécialisées sont capables de phagocyter (macrophages et certains Protozoaires).

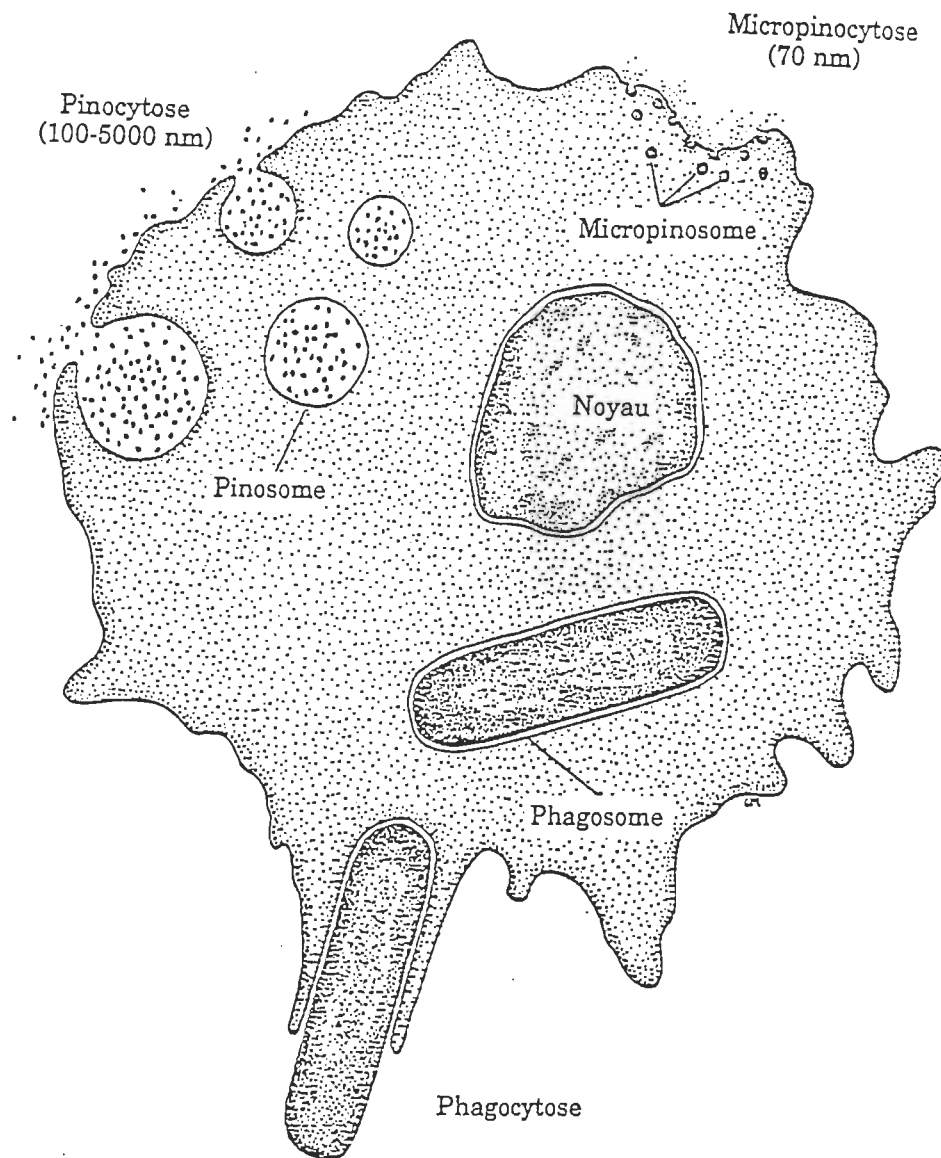


Figure 3: Schéma des différents modes d'endocytose

Des particules solides sont ingérées par phagocytose pour former un phagosome. Des volumes relativement importants de substances solubles sont amenés dans la cellule par pinocytose, et de plus petits volumes entrent par micropinocytose. On a alors respectivement la formation de pinosomes ou de micropinosomes. (Schéma d'après Thorpe N.O. 1984)

iii) Contrairement à la pinocytose, la phagocytose requiert la participation des protéines contractiles de la cellule car si on utilise des inhibiteurs de polymérisation de l'actine, telle la cytochalasine, il y a inhibition de la phagocytose. Par contre de tels inhibiteurs n'affectent pas la pinocytose.

iv) Comme dernière distinction entre les deux processus mentionnons le fait que la phagocytose requiert la participation de récepteurs membranaires, alors que pour la pinocytose ce n'est pas toujours le cas. Lorsqu'il n'y a pas de récepteurs le contenu du pinosome est identique à celui du milieu extérieur (pour revue, voir Silverstein S.C. *et al* . 1977, Mellman I. *et al* . 1986).

La phagocytose se déroule en plusieurs étapes : tout d'abord, un signal informe la cellule de la présence d'une substance à ingérer. Ce signal provoque à l'intérieur de la cellule une série de réactions qui vont la faire se déplacer dans la direction de la proie. C'est ce que l'on appelle la chimiotaxie. Lorsque la cellule arrive en contact avec la proie une phase cruciale se déroule, la reconnaissance.

S'il y a reconnaissance, la cellule émet des pseudopodes qui vont englober la substance à ingérer, puis la fusion des membranes autour de la proie va former le phagosome. Celui-ci va fusionner avec des lysosomes et le processus de digestion commence.

1.2.2. Mécanisme de la phagocytose chez *Entamoeba histolytica*

En 1980 l'équipe de Ravdin met en évidence trois des étapes qui ont lieu au cours de la phagocytose chez *Entamoeba histolytica*. Ce sont: l'adhésion, la cytolyse, et l'ingestion. Ils montrent que le galactose et le N-acétyl-D-galactosamine inhibent l'adhésion de l'amibe aux cellules d'ovaire de hamster (CHO cells). Suite à l'inhibition de l'adhésion de l'amibe à la cellule cible il y a inhibition de la cytolyse et la phagocytose de ces cellules. Le galactose inhibe également l'adhésion de l'amibe aux érythrocytes, aux neutrophiles et à des cellules de mammifères en culture (Ravdin J.I. 1989). En 1987 Petri *et al.* isolent cette lectine qui est une protéine de 170 kDa liée à la membrane plasmique.

Par la suite, d'autres protéines d'adhésion ont été identifiées chez *Entamoeba histolytica*. En particulier, Kobiler *et al.* (1980) ont identifié une lectine active à pH acide et qui est inhibée par des trimères ou tétramères de la N-acétyl-D-glucosamine. Cette protéine a été isolée par Meza *et al.* en 1987. Il s'agit d'une protéine de 220 kDa que l'ont retrouve dans plusieurs souches d'*Entamoeba histolytica*, de même que chez la souche Laredo.

La production d'anticorps monoclonaux (Arroyo R. *et al.* 1987) qui inhibent l'adhésion aux globules rouges, l'érythrophagocytose ainsi que l'effet cytolytique de l'amibe sur des cellules en culture, a permis d'identifier une protéine amibienne d'environ 112 kDa, appelée adhésine et qui participe spécifiquement à l'adhésion du trophozoïte aux cellules épithéliales et aux

érythrocytes.

Après l'adhésion de l'amibe à la cellule cible par l'intermédiaire de lectines, la lyse de la proie requiert la participation de l'actine. En effet l'utilisation des cytochalasines B et D qui sont des inhibiteurs de polymérisation de l'actine, inhibe la cytolyse (Guerrant R. L. *et al* . 1981).

Le calcium semble également jouer un rôle important au cours de la phagocytose car des chélateurs du calcium (EDTA et EGTA), des antagonistes du calcium intracellulaire (TMB-8), ainsi que des bloqueurs de canaux à calcium tels le verapamil et le bepridil, inhibent la lyse, suggérant ainsi que des flux de calcium sont impliqués dans le processus (Ravdin J.I. *et al* . 1982 ,Ravdin J.I. *et al* . 1985).

Long-Krug *et al* . (1985) ont identifié deux phospholipases impliquées dans la phagocytose. Une de ces phospholipases est calcium dépendante, a une activité optimale à un pH de 7,5 et est associée à la membrane de l'amibe. La deuxième est calcium indépendante et son pH optimal est à 4,5. La phospholipase calcium dépendante est associée à la surface membranaire de l'amibe. Des inhibiteurs pharmacologiques des phospholipases, tels la quinacrine, la phosphatidylcholine et l'inhibiteur de Rosenthal inhibent la cytolyse de cellules cibles par l'amibe, mais également l'activité enzymatique de la phospholipase calcium dépendante mesurée *in vitro* (Ravdin J.I. *et al* 1985). Ceci indique que la phospholipase calcium dépendante jouerait un rôle important lors de la cytolyse des cellules cibles par l'amibe.

Entamoeba histolytica contient aussi d'autres substances qui, dans certaines conditions, peuvent être relâchées *in vitro*. Ce sont des protéases, thiol protéinases neutres et acide (Mc Laughlin J. *et al.* 1977), protéinases (Mc Gowan K. *et al.* 1982, Lushbaugh W. B. *et al.* 1984, Schulte W. *et al.* 1989), une collagénase présente chez les vraies *Entamoeba histolytica* mais absente chez Laredo (Munoz M. L. *et al.* 1982, 1984) et une protéine formant des pores, appelée amoebapore (Lynch E.C. *et al.* 1982, Young J.D.E. *et al.* 1982).

L'amoebapore, qui est présent dans toutes les souches d'*Entamoeba histolytica* et chez *Entamoeba invadens* mais absent de la souche Laredo (Keller F. *et al.* 1988), est une protéine de 14 kDa qui s'incorpore spontanément dans les membranes des cellules cibles (Lynch E.C. 1982, Young J.D.E. *et al.* 1982, Rosenberg I. *et al.* 1988, Keller F. *et al.* 1988). Dans les trophozoïtes, l'amoebapore est présent à l'état fortement agrégé sous forme de particules denses (Rosenberg I. *et al.* 1985). Cette protéine en s'incorporant dans la membrane des cellules cibles induit la formation de canaux qui entraînerait une fuite des ions de la cellule cible et sa mort.

La mise en évidence des trois étapes de la phagocytose: adhésion, cytolyse, et l'ingestion, ainsi que la découverte de toute une série de molécules qui participeraient à ces trois étapes a permis d'établir un schéma probable du mécanisme d'attaque d'*Entamoeba histolytica* (figure 4).

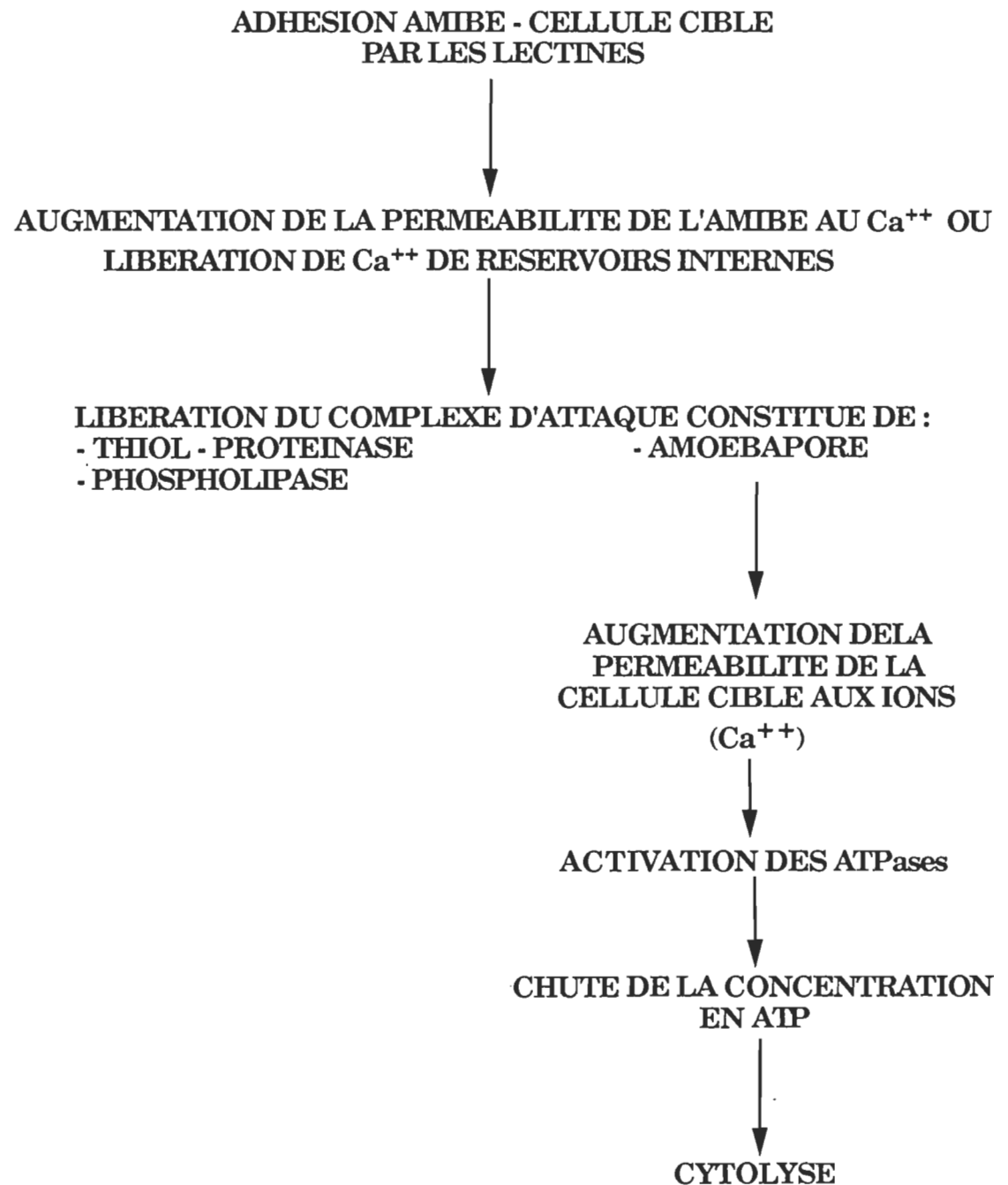


Figure 4: Schéma hypothétique du mécanisme d'attaque par *Entamoeba histolytica*

L'adhésion d'*Entamoeba histolytica* à la cellule cible par l'intermédiaire des lectines aurait pour effet d'augmenter la perméabilité de l'amibe au calcium ou de libérer du calcium provenant de réservoirs internes. Ces flux de calcium provoqueraient la libération du complexe d'attaque de l'amibe qui serait constitué de thiol-protéinases, de phospholipases et de l'amoebapore. Suite à la libération de l'amoebapore par l'amibe, son incorporation dans la membrane de la cellule cible y produirait une diffusion des ions à l'encontre de leur gradient de concentration. Le système de transport actif de la cellule cible tenterait alors de s'opposer à ce déséquilibre. Comme, beaucoup de ces transporteurs utilisent l'ATP, l'incorporation de l'amoebapore dans la membrane de la cellule cible aboutirait à une diminution du taux d'ATP, ce qui conduirait à la mort de la cellule. L'incorporation des canaux dans la membrane de la cellule cible pourrait également y induire une entrée de calcium. Or l'augmentation du calcium intracellulaire provoque une dépolymérisation des microtubules, ce qui conduit également à la mort de la cellule. Quant aux autres protéines du complexe d'attaque leur mécanisme d'action n'est pas encore clair (Gitler C. *et al* . 1986). En ce qui a trait aux autres molécules dont il a été fait mention (protéase, collagénase), leur effet nécessiterait des temps d'exposition plus longs avant qu'il ne se manifeste.

Dans ce modèle, les flux de calcium dans l'amibe suite à l'adhésion par l'intermédiaire des lectines agiraient comme médiateur de libération du complexe d'attaque de l'amibe. Cependant, Ravdin *et al* . (1988) ont montré que suite à l'adhésion, il y a une élévation brusque et irréversible du taux de

calcium dans la cellule cible alors que dans l'amibe on ne note aucune variation de ce taux de calcium. Ceci remet donc en cause le rôle du calcium comme médiateur de libération du complexe d'attaque et donc le schéma proposé.

Après la cytolyse par contact de la cellule cible, l'amibe ingère des cellules mortes, bien qu'elle puisse également ingérer des cellules vivantes (Martinez-Palomo A. 1988 b). En général les souches pathogènes présentent de hauts taux de phagocytose, alors que les souches non pathogènes et les souches peu virulentes ont de faibles taux de phagocytose (Trissl D. 1978)

La revue de la littérature montre qu'un très grand nombre d'études portant sur l'aspect biochimique du mécanisme d'attaque par l'amibe ont été réalisées. Quant à l'aspect morphologique de la phagocytose les données disponibles sont pour la plupart anciennes (Cheng Yee Lowe *et al* . 1970, Zaman V. 1970, Chevez A. *et al* . 1972, 1974 a,b, Trevino Garcia N. *et al* . 1972, 1973 a,b, Knight R. *et al* . 1975, Mc Caul T.F. 1977, Trissl D. 1978 a,b, Mora-Galindo J. *et al* . 1978, 1982, Sepulveda B. 1982, Bailey G.B. 1985, Martinez-Palomo A. *et al* . 1985, Martinez-Palomo A. 1982). D'après ces études, le mécanisme d'invasion et de destruction de la muqueuse intestinale se ferait comme suit (Mora-Galindo J. *et al* . 1978, 1982): i) adhésion des trophozoïtes à l'épithélium et préférentiellement aux zones de desquamation, ii) invasion de la couche épithéliale par phagocytose et séparation des cellules épithéliales en desquamation avec comme conséquence la formation de micro-ulcérations, iii) dissémination des trophozoïtes à la lamina propria

par phagocytose et déplacement actif. Simultanément les dimensions des micro-ulcérations augmenteraient par phagocytose et détachement des cellules épithéliales, iv) destruction de la muqueuse intestinale par confluence des micro-ulcérations. Dans des études portant plus spécifiquement sur l'interaction directe de l'amibe sur la cellule cible, certains auteurs ont rapporté que des lysosomes de surface seraient impliqués dans le processus de phagocytose (Deas J.E. *et al.* 1977, Eaton R.D. *et al.* 1970, Trevino Garcia N. *et al.* 1973 a,b, 1974), mais il se pourrait que ce ne soit que des artéfacts. Du point de vue quantitatif, il y a une corrélation directe entre le taux de phagocytose des globules rouges par l'amibe et son degré de pathogénicité, les souches pathogènes phagocytant à des taux beaucoup plus élevé que les souches non pathogènes (Trissl D. 1978 a,b). De plus, il semble qu'au cours de l'ingestion les érythrocytes subissent des déformations (Trevino Garcia N. *et al.* 1972, 1973 a,b, Chevez A. *et al.* 1972, 1974 a).

Malgré tous les efforts faits pour essayer d'identifier "le facteur" responsable de la très grande capacité de destruction des cellules par *Entamoeba histolytica*, il n'a pas été possible de l'identifier. En fait, cette capacité serait la résultante de toute une série de facteurs: une machinerie enzymatique, la motilité de la cellule, l'ingestion en tant que telle et les contraintes mécaniques que l'amibe est capable de générer (Smith J.M. *et al.* 1982, Gicquaud C. 1978, Martinez-Palomo A. *et al.* 1985).

1.3. But du travail

Ainsi que nous l'avons vu dans la section précédente, de très nombreux travaux ont été réalisés dans le but de comprendre le mécanisme d'attaque des cellules par *Entamoeba histolytica*. Cependant ces travaux ont essentiellement porté sur l'aspect biochimique du phénomène et très peu de recherches ont été entreprises sur l'aspect physique et mécanique de la phagocytose (Martinez-Palomo A. *et al.* 1985), or ceux-ci jouent probablement un rôle important.

En effet, ainsi que nous l'avons dit précédemment, *Entamoeba histolytica* s'attaque à une grande diversité de tissus (paroi de l'intestin, foie, poumon, cerveau, os), constitués de cellules de natures différentes. Les propriétés physiques et mécaniques de ces cellules sont très différentes. La question est donc de savoir si la déformabilité de la cellule cible influence le mode d'ingestion de l'amibe.

Dans la première partie de ce travail, nous avons fait une étude morphologique, en microscopie optique et électronique, de la phagocytose de globules rouges par *Entamoeba histolytica*.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'influence de la déformabilité de la cellule cible au cours de cette phagocytose.

Nous avons utilisé la souche Laredo d'*Entamoeba histolytica* qui est très

commode à manipuler car active à température ambiante, et qui de plus, étant maintenue au laboratoire depuis longtemps, est bien connue. La cellule cible choisie est le globule rouge humain. Le choix de l'érythrocyte a été guidé par plusieurs raisons;

i) *Entamoeba histolytica* est hématophage.

ii) L'érythrocyte est une des cellules les mieux connues tant au niveau de sa composition biochimique que de ses propriétés physiques et mécaniques (pour revue voir Vann Bennett 1985, 1989, Chassis J.A. *et al* . 1987).

iii) De très nombreuses techniques de mesure de la déformabilité des globules rouges ont été mises au point, ainsi que des méthodes permettant de modifier cette déformabilité (pour revue voir Chien S. 1977, 1987).

Ainsi, à l'aide d'une cellule cible, l'érythrocyte, dont la rigidité va être accrue par des traitements à des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, qui a pour effet de ponter les protéines membranaires du cytosquelette et l'hémoglobine (Morel F.M.M. *et al* . 1971), nous allons pouvoir étudier le rôle des propriétés mécaniques de la cellule cible au cours de la phagocytose par l'amibe.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. Culture des amibes

La souche Laredo d'*Entamoeba histolytica* , isolée par Connell (Dreyer D. 1961), a été cultivée à 28° C, en présence de bactéries non identifiées, dans des flacons Corning de 70 ml, contenant le milieu TP-S-1 de Diamond L.S.(1968 b).

La croissance des bactéries est contrôlée par l'addition d'antibiotiques: 250 unités/ml de pénicilline G (benzylpénicilline de Sigma) plus 250 µg/ml de sulfate de streptomycine (Sigma)

2.2. Préparation des globules rouges

Les échantillons de sang frais sont prélevés sur des donneurs, dans des tubes de prélèvement (vacutainer) de 10 ml contenant 143 U.S.P. d'héparine sodique. Après 10 minutes de centrifugation à 1000 g le plasma et la couche leuco-plaquettaire (buffy coat) ainsi que la couche supérieure de globules rouges sont éliminées. Les globules rouges sont ensuite lavés trois fois dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH=7,4 puis utilisés immédiatement.

2.3. Préparation de "ghosts" ou "fantômes" d'érythrocytes chargés de carboxyfluorescéine

La préparation de "ghosts" chargés de carboxyfluorescéine se fait par choc osmotique d'après la technique de Ihler *et al.* (1973) légèrement modifiée:

- 100 µl de culot globulaire lavé sont placés dans 1000 µl de 5(6)-carboxyfluorescéine (Eastman Kodak Rochester) 1,5 mM dans l'eau, pH=7,4 pendant 2 minutes.

- On ajoute ensuite 5 ml de NaCl 0,2 % pour faire le choc osmotique. Après 60 secondes, l'addition de 1,3 ml de NaCl 4,75% ramène les cellules à l'isotonicité.

- Les "ghosts" sont ensuite centrifugés 20 minutes à vitesse maximale dans une centrifugeuse de table de marque IEC modèle clinique. Ils sont ensuite resuspendus dans 10 ml d'une solution contenant 1,8 ml de NaCl 4,75% et 8,2 ml de carboxyfluorescéine 1,5 mM dans l'eau, pH=7,4 .

- On laisse reposer à 37 °C pendant 60 minutes. Les "ghosts" sont encore lavés 3 fois dans le NaCl 0,9 % avant leur emploi.

2.4. Traitement des globules rouges et des "ghosts" à la glutaraldéhyde

Protocole:

Immédiatement après avoir été prélevés, les érythrocytes sont lavés et

traités de la manière suivante:

- 100 μ l de culot globulaire ou de "ghosts" sont ajoutés et mélangés vigoureusement à 1000 μ l d'une solution de glutaraldéhyde fraîchement préparée à la concentration désirée (de 0 à 0,055 %) dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH=7,4. La glutaraldéhyde est de grade ultrapure pour l'histochemie et provient de chez Mecalab. Elle est sous forme aqueuse à 25 %, conservée sous azote dans des ampoules scellées.

- Les érythrocytes sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante puis lavés trois fois dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH=7,4 .

2.5. Etude en microscopie optique de la phagocytose de globules rouges

2.5.1. Etude dynamique de l'interaction amibes-globules rouges

L'étude de l'interaction amibes-globules rouges est réalisée en ajoutant à 1 ml d'une culture d'amibes, 100 μ l d'une suspension contenant 4.10^8 globules rouges traités ou non, soit un rapport de 400 érythrocytes par amibe. Les amibes âgées d'une dizaine de jours sont amenées à une concentration de 10^6 cellules/ml par élimination de l'excès de milieu de culture. Les globules rouges sont en suspension dans le tampon phosphate 0,1M à pH=7,4.

L'observation de ces interactions se fait directement au microscope (Wild Leitz) équipé d'un contraste de phase ou de l'optique de Nomarski ou encore, en fluorescence lorsque les "ghosts" sont chargés de carboxyfluorescéine.

2.5.2. Etude quantitative de l'interaction-amibes globules rouges

i) Mise en contact des amibes et des érythrocytes

Deux cultures de 30 ml d'amibes en fin de phase exponentielle de croissance (environ 10 jours) sont mélangées et réparties dans 12 tubes de culture Nunclon (Nunc) à fond plat pour l'observation au microscope. Ces tubes sont centrifugés 5 minutes à basse vitesse (graduation 2 d'une centrifugeuse de table de marque IEC, modèle clinique, soit environ 300g) afin de concentrer les amibes. L'excès de surnageant est éliminé par aspiration afin d'obtenir un volume final de 1ml contenant 10^6 cellules. Les amibes remises en suspension sont placées à 34° C pendant 15 minutes. Cent (100) µl d'une suspension contenant 4.10^8 globules rouges dans le tampon phosphate 0,1 M, ph=7,4 et traités à la glutaraldéhyde (de 0 à 0,055%) sont mis en présence des amibes. L'incubation se poursuit à 34° C pendant 20 minutes.

ii) Elimination de l'excès de globules rouges

La technique généralement utilisée pour éliminer l'excès de globules rouges non ingérés par l'amibe consiste à les lyser par addition d'eau distillée (Trissl D. *et al.* 1978 a-b, Orozco E. *et al.* 1982, 1983, 1985). L'inconvénient de cette méthode est, qu'en détruisant les globules rouges en cours d'ingestion, elle ne permet pas d'observer le processus de la phagocytose, mais seulement le résultat final de l'ingestion. De plus, la destruction des globules rouges par choc osmotique n'est possible que dans le cas de globules rouges non traités à la glutaraldéhyde, car ce traitement les rend résistants à la lyse. Nous avons dès lors procéder par lavage pour éliminer l'excès de globules rouges .

Protocole:

Après 20 minutes d'incubation des amibes avec les érythrocytes, le surnageant est aspiré. Du milieu de culture frais (4-5ml) est ajouté et les amibes remises en suspension. On laisse reposer 5 minutes, le temps que les amibes sédimentent et adhèrent à la surface plane du tube. Le surnageant contenant des érythrocytes est pipeté. Cette opération de lavage est encore répétée deux fois. On procède ensuite à la fixation et à la coloration des cellules.

iii) Coloration des globules rouges à la benzidine

Afin de différencier dans les amibes les vacuoles qui contiennent des fragments de globules rouges des vacuoles préexistantes et qui contiennent d'autres débris, nous avons utilisé la technique de coloration des érythrocytes à la benzidine mise au point par Trissl *et al.* (1978 a) que nous avons légèrement modifiée.

Protocole:

Les amibes débarrassées de l'excès de globules rouges par les lavages successifs et resuspendues dans 0,5ml de milieu de culture frais, sont fixées dans les tubes Nunclon par addition de 7-8 ml de glutaraldéhyde 2,5% dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH=7,4 . La fixation dure 30 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite lavés trois fois dans le tampon phosphate de sodium 0,1M, pH=7,4.

Les amibes fixées sont lavées puis vigoureusement resuspendues au vortex dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH=7,4. Elles sont ensuite colorées à température ambiante par l'addition de 4 ml de colorant à la benzidine fraîchement préparé et dont la composition est la suivante:

Préparation de 10 ml de colorant à la benzidine

Tampon Tris HCl 0,1 M, pH=9	9,5 ml
H ₂ O ₂ 2,5% frais préparé à partir de H ₂ O ₂ 29 %	0,2 ml
benzidine (3-3-diaminobenzidine tétrahydrochloride, Sigma)	20 mg

Après 30 minutes, les amibes sont lavées 3 fois au tampon phosphate de sodium 0,1M, pH=7,4 et resuspendues dans 1 ml de ce même tampon.

iv) Comptage des phagocytoses

Le comptage des phagocytoses se fait par observation directe des échantillons d'amibes placées entre lame et lamelle. Les comptages se font sur 100 amibes prises au hasard dans le champ du microscope optique. Chaque échantillon est compté trois fois et l'expérience répétée quatre fois.

v) Expression des résultats

Les résultats des comptages sont représentés de deux façons différentes. Dans le premier cas, le nombre moyen de phagocytoses classiques et de microphagocytoses sont représentés en fonction de la concentration de

glutaraldéhyde utilisée lors du traitement des érythrocytes.

La deuxième façon de représenter ces résultats des comptages des deux types de phagocytose est de calculer le rapport des microphagocytoses et des phagocytoses classiques pour les diverses concentrations de glutaraldéhyde utilisées lors du traitement des globules rouges.

2.6. Etude en microscopie électronique de la phagocytose de globules rouges par *Entamoeba histolytica*

Dix (10ml) d'une culture d'amibes en fin de phase exponentielle de croissance (âgée d'environ 10 jours) contenant 10^6 cellules/ml est transférée dans une petite boîte de Petri de 5 cm de diamètre. On les laisse à 34° C pendant 30 minutes afin de permettre aux amibes de s'attacher à la surface de la boîte. On ajoute alors 300 µl de globules rouges à une concentration de $4 \cdot 10^6$ cellules/µl en suspension dans le tampon phosphate 0,1M, pH=7,4 .

Après différents temps d'incubation à 34° C, le surnageant est éliminé par aspiration, et les cellules sont fixées par l'introduction directe dans la préparation de glutaraldéhyde 2,5 % à 4° C dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH=7,4. La fixation dure une heure à 4° C. Après trois lavages dans le tampon phosphate de sodium 0,1M, pH=7,4, les spécimens sont post fixés une heure à l'acide osmique (OsO_4) 1% dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH=7,4. Après deux lavages dans le tampon phosphate, les

échantillons sont déshydratés par un gradient d'éthanol (25, 50, 75 et 100 %) et deux lavages à l'oxyde de propylène. L'inclusion se fait dans la résine de SPURR (Spurr A. 1969) (vinylcyclohexène dioxide; 10 g, éther diglycidyl de polypropylèneglycol; 6 g, nonényl succinique anhydre; 26 g, diméthylamino-éthanol ;1 g). La polymérisation des blocs dure 5 jours à 40° C. Les coupes fines (dorées pourpres) sont colorées à l'acétate d'uranyl 4% dans le méthanol 50% pendant 1 heure puis au citrate de plomb selon Reynolds S. 1963 pendant une heure. Les préparations sont alors observées au microscope électronique (Phillips modèle 201).

2.7. Caractérisation des globules rouges traités à la glutaraldéhyde

2.7.1. Mesure de la déformabilité globale des globules rouges

2.7.1.1. Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de filtration sur membranes de polycarbonate

i) Principe

Le principe consiste à mesurer la variation de pression qui se produit au cours de la filtration d'une suspension de globules rouges à travers une membrane percée de pores dont le diamètre calibré est inférieur ou égal à celui des globules rouges. Le montage de base généralement utilisé dans ce type de mesure est représenté à la figure 5 (Leblond P.F. *et al.* 1979).

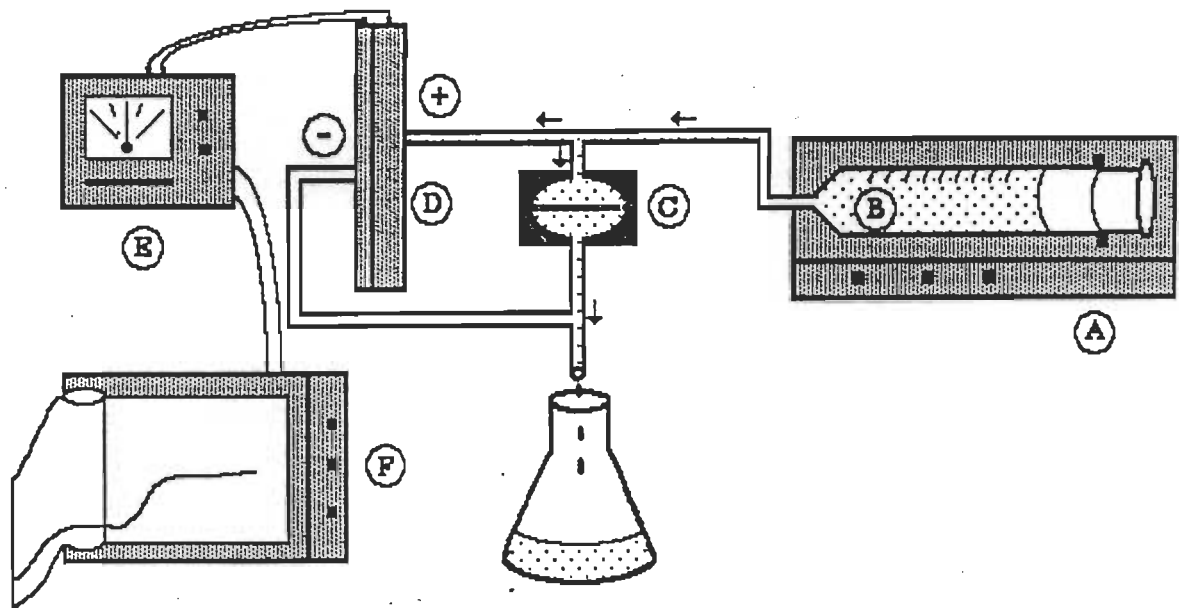


Figure 5 : Schéma du montage du système de filtration

(D'après Leblond P.F. *et al.* 1979)

A : Pompe à seringue

B: Seringue contenant la suspension de globules rouges

C : Support à filtre contenant la membrane de filtration

D: Transducteur de pression

E: Appareil de contrôle du transducteur

F : Enregistreur

Dans un tel dispositif, la pompe (A) en actionnant le piston de la seringue (B), assure un débit constant de la suspension de globules rouges. Celle-ci est dirigée d'une part sur la membrane de filtration (C) et d'autre part sur la membrane du transducteur de pression (D). Comme les globules rouges ont un diamètre supérieur à celui des pores ils ne peuvent les franchir sans déformation. Il va donc y avoir obstruction des pores. Cependant, comme la pompe assure un débit constant, cette obstruction va provoquer une augmentation de pression qui va forcer les érythrocytes à passer à travers les pores. La pression P développée et mesurée au niveau du transducteur de pression sera fonction de la déformabilité des globules rouges (Chien S. *et al* . 1983, Schmalzer E.A. *et al* . 1983). La figure 6 schématise le comportement d'un globule rouge passant à travers la membrane.

ii) Application de la technique de filtration aux globules rouges traités à la glutaraldéhyde

Afin de mesurer la rigidité des globules rouges traités à la glutaraldéhyde, nous avons utilisé cette technique de filtration. Cependant même pour de très faibles concentrations de glutaraldéhyde, la perte de déformabilité des érythrocytes est telle que, lors de leurs passages à travers la membrane filtrante, la pression générée dépasse les valeurs mesurables avec le transducteur de pression. Ces valeurs élevées de pression P pour des globules rouges traités à la glutaraldéhyde est en accord avec les résultats de

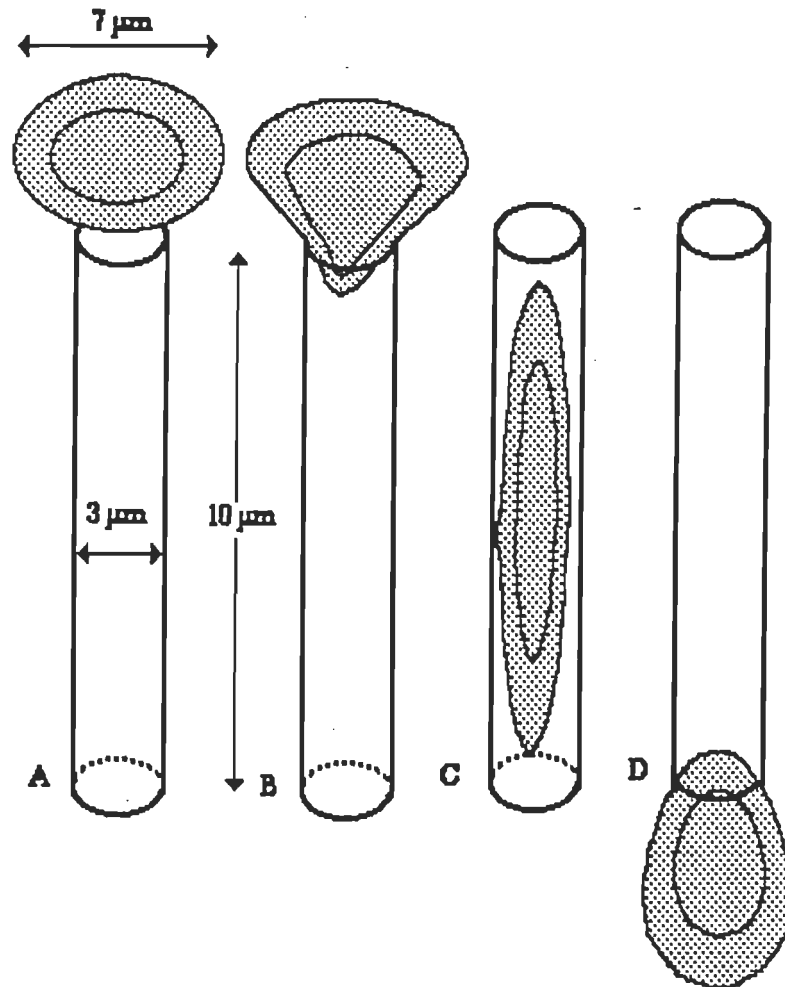


Figure 6 : Comportement d'un globule rouge dans un pore de la membrane

Ici est schématisé le comportement d'un globule rouge franchissant un pore de la membrane. En (A) le globule rouge arrive sur le pore dont le diamètre est inférieur ou égal au sien. En (B), la pression va provoquer une déformation du globule rouge ce qui va permettre son passage à travers le pore (C et D). Plus le globule rouge sera déformable, moins grande sera la pression nécessaire pour lui faire franchir le pore.

Reinhart *et al.* (1984). Il a donc fallu adapter la technique.

iii) Protocole expérimental

a) Système de filtration

La figure 5 représente les différentes composantes du système mis au point par Leblond P.F. *et al.* (1979), et que nous avons utilisé. La suspension de cellules est placée dans une seringue jetable de 20 ml. Elle est installée sur une pompe à seringue (Sage Instrument, modèle 355) qui assure le débit constant de la suspension. La seringue est raccordée par des tuyaux de plastique et par un raccord en T au support à filtre (Millipore, Swinny, N° cat: XX 3001200) de 13 mm de diamètre, d'une part, et, d'autre part, à la borne positive d'un transducteur de pression (Validyn Engineering Corp., Northridge, Calif, Modèle MP-45-1). La borne négative du transducteur et la sortie du support à filtre sont raccordées ensemble par un deuxième raccord en T et le filtrat est recueilli dans un bécher.

Le transducteur de pression, qui permet de mesurer des pressions allant jusqu'à 100 mm Hg, est branché sur un indicateur de pression (Validyne, modèle CD-12) et à un enregistreur Corning 840. Le transducteur est calibré à l'aide d'un manomètre à eau.

b) Préparation des échantillons de globules rouges

Après avoir prélevé le sang et avoir lavé les globules rouges, on traite 2 fois 600 μ l de culot globulaire dans 2 fois 6 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH=7,4 contenant la glutaraldéhyde à la concentration désirée (0 à 0,055 %). Après 10 minutes d'incubation, les globules rouges sont lavés 3 fois dans le tampon phosphate de sodium 0,1M, pH=7,4 préalablement filtré sur filtre millipore de 0,22 μ m afin de le débarrasser de toute particule risquant d'interférer dans les mesures de pression mesurée lors de la filtration des érythrocytes. Les globules rouges sont alors amenés à un hématoците de 5% par addition de tampon phosphate préfiltré (l'hématoците étant une concentration de cellules définie comme suit: c'est le rapport du volume occupé par les érythrocytes divisé par le volume total de la suspension). La rigidité des globules rouges est immédiatement mesurée par filtration de la suspension d'érythrocytes dans le système de Leblond *et al.* 1979. Le nombre de globules rouges présents par unité de volume de suspension est déterminé à l'hématimètre.

c) Les membranes filtrantes

Les membranes sont des filtres de polycarbonate (Nuclepore, No cat.: SN110414, Lot 51 I 6B6) de 13 mm de diamètre. La surface effective de filtration est de 0,71 cm². Les pores des filtres ont 8 μ m de diamètre (valeur nominale), et 6,9 μ m de diamètre en valeur réelle. Leur densité est de 1×10^5

pores/cm².

d) Vitesse de filtration

Dans toutes les expériences effectuées, la vitesse de filtration est de 0,82 ml/min.

e) Vitesse de défilement du papier

Tous les enregistrements de filtration ont été faits à une vitesse de défilement du papier de l'enregistreur de 30 cm/min.

f) Traitement des courbes de filtration

Puisque nous ne pouvons mesurer la pression P nécessaire pour faire passer les globules rouges à travers les pores de la membrane de filtration, pour caractériser la déformabilité des érythrocytes, nous avons utilisé la pente de la phase linéaire de l'augmentation de pression, c'est à dire $p = a/b$ (figure 7). Cette pente p sera exprimée en unité arbitraire. S'il fallait lui attribuer une unité ce serait, à une constante près, des $N\ m^{-2}\ min^{-1}$. Plus les globules rouges seront rigides, plus grande et plus rapide sera l'augmentation de pression enregistrée lors du passage des cellules sur la membrane de filtration et par conséquent la pente p sera grande. Cette pente dépendra également du nombre de cellules présentes dans la suspension, de la vitesse de filtration, et de la vitesse de défilement du papier.

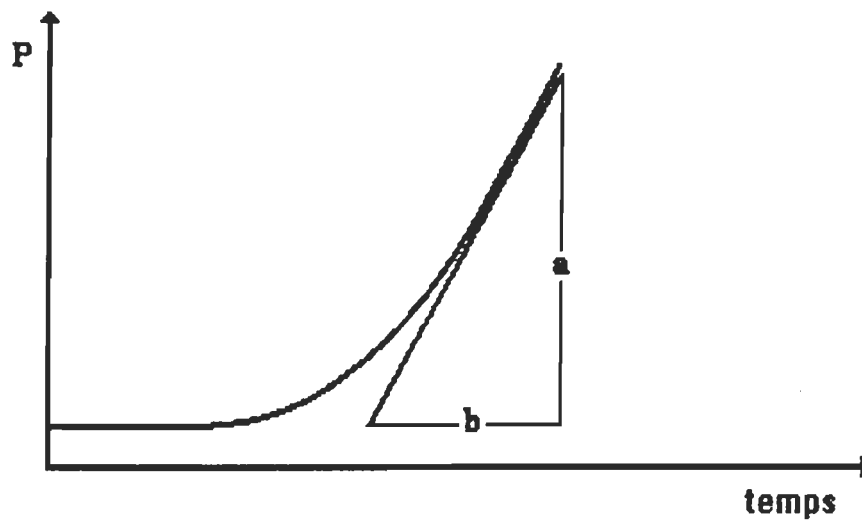


Figure 7: Exemple de courbe de filtration

Dans cet exemple est représentée l'augmentation de pression générée par le passage des érythrocytes à travers la membrane de filtration. La pente de la tangente de la partie linéaire de la courbe permet de caractériser la déformabilité des globules rouges. Cette pente p est égale à: a / b .

Il est donc impératif de conserver tous ces paramètres (nombre de cellules, vitesse de filtration et vitesse défilement du papier) constants au cours des expériences.

2.7.1.2. Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de détermination du microhématocrite

i) Principe (Chien S. *et al* . 1968)

Une suspension d'érythrocytes est introduite dans un capillaire à hématocrite (figure 8 **A**), puis est soumise à une centrifugation. Comme le montre le schéma **B** de la figure 8, au cours de la centrifugation, les globules rouges non traités à la glutaraldéhyde, étant très déformables, vont s'entasser en laissant très peu d'espace entre eux. Lorsqu'il y a diminution ou perte de la déformabilité des érythrocytes, ceux-ci vont s'entasser en laissant entre eux des espaces plus ou moins grands. De ce fait, le volume occupé par le culot globulaire de cellules peu déformables (schéma **C** de la figure 8) sera beaucoup plus grand que celui des globules rouges déformables. Leur volume apparent sera donc plus grand.

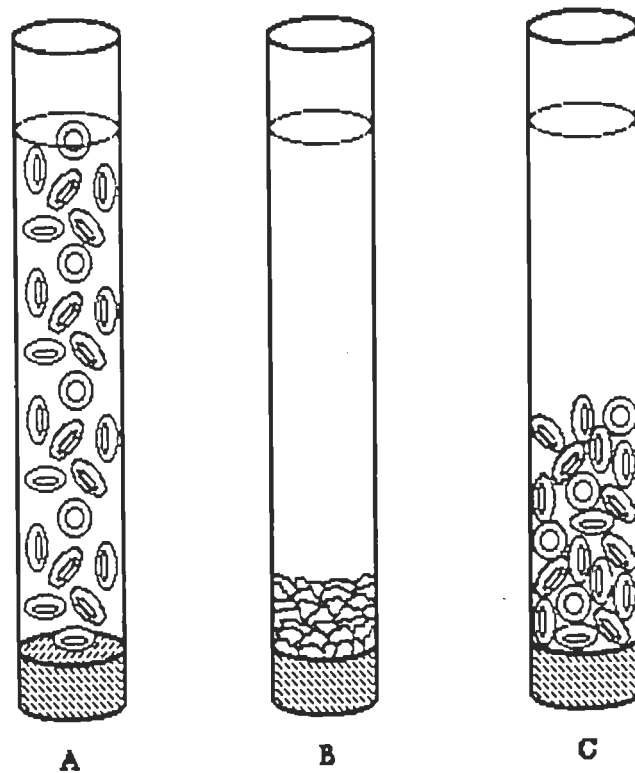


Figure 8: Schéma illustrant le principe de la mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique du microhématocrite

En **A**, la suspension de cellules est introduite dans le capillaire. Après centrifugation, en **B**, les globules rouges normaux, déformables, se sont entassés en ne laissant aucun espace entre eux. En **C**, des globules rouges rigidifiés, laissent des volumes plus ou moins grands entre eux. Le volume du culot globulaire ou hématocrite est donc plus élevé qu'en **B**.

ii) Protocole expérimental

Des capillaires à microhématocrite contenant les érythrocytes traités à des concentrations de glutaraldéhyde variant entre 0 à 0,050%, en suspension dans le tampon phosphate 0,1M, pH=7,4 à un hématocrite d'environ 40%, sont préparés en triple exemplaire (l'hématocrite étant une concentration de cellules définie comme suit: c'est le rapport du volume occupé par les érythrocytes divisé par le volume total de la suspension). Les tubes sont centrifugés à 13460 g pendant 1 ou 3 minutes dans une centrifugeuse pour microhématocrite (marque IEC, modèle MB). Les hématocrites sont lus immédiatement. Le nombre de globules rouges présents par unité de volume dans la suspension de départ est déterminé au compteur de cellules ("Coulter-Counter"). Les expériences sont répétées trois fois.

iii) Traitement des résultats

a) calcul du nombre de globules rouges présents dans un hématocrite de 1%.

Soit N le nombre de globules rouges présents dans 1ml de suspension, et mesuré au "Coulter-Counter". Soit H la valeur de l'hématocrite de la suspension, déterminée par le microhématocrite. Alors, $N/H = N_i$ où N_i est le nombre de cellules par ml dans un hématocrite de 1%.

b) calcul du coefficient d'augmentation du volume apparent des globules rouges.

Soit N_0 le nombre de globules rouges non traités par ml dans un hématocrite de 1% et N_x le nombre de globules rouges traités à la concentration x de glutaraldéhyde présents dans 1 ml de suspension à un hématocrite de 1%. Alors, $C_x = N_0/N_x$ représente le coefficient d'augmentation du volume des globules rouges traités à $x\%$ de glutaraldéhyde.

c) calcul du volume apparent des globules rouges.

Soit V_0 le volume des globules rouges non traités, tel que déterminé au "Coulter-Counter" et C_x le coefficient d'augmentation apparent des globules rouges traités à $x\%$ de glutaraldéhyde. Alors, $V_x = V_0 C_x$ représente le volume apparent des globules rouges traités. Plus le volume apparent V_x est grand, moins le globule rouge est déformable.

2.7.1.3. Mesure de la déformabilité des globules rouges au "Coulter-Counter"

i) Principe

Le principe du compteur électronique de cellules, développé par Coulter,

est basé sur le changement de résistance électrique qui se produit lorsqu'une particule en suspension dans un milieu conducteur passe à travers un orifice étroit dans lequel règne un champ électrique. Grover *et al* . (1969 a,b) ont expliqué la relation existant entre la déformabilité cellulaire et le volume de la cellule déterminé électroniquement. Pour des particules non conductrices, ce sont principalement leur forme et leur volume qui déterminent leur résistance électrique. De ce fait, deux particules de volume et de conductivité identiques peuvent avoir, au Coulter-Counter, des volumes différents si leur forme diffère.

Lorsque des globules rouges normaux passent à travers l'orifice de mesure d'un tel instrument, la force hydrodynamique qu'ils subissent modifie généralement leur géométrie, les faisant passer de la forme habituelle de disque biconcave à un ellipsoïde étiré. Ce changement de géométrie s'accompagne d'une diminution de la résistance électrique et donc, du volume déterminé par cette méthode. Inversement, lorsque les globules rouges sont rigidifiés, la force hydrodynamique peut être insuffisante pour déformer l'érythrocyte et ainsi, la diminution de la résistance électrique associée à la forme ne se produira pas. De ce fait, la déformabilité relative de deux populations de cellules ayant un volume et une conductivité identiques peut être déterminée à partir du rapport de leur volume mesuré électroniquement.

ii) Protocole

Cinquante (50) μ l de globules rouges traités ou non traités à la glutaraldéhyde, en suspension dans du tampon phosphate de sodium 0,1M, pH=7,4 et à un hématocrite avoisinant 40% sont injectés dans un compteur électronique de cellules de marque Collect modèle 8. Le compteur fournit directement le nombre de cellules présentes par unité de volume, ainsi que leur volume. A partir de ces deux valeurs, il fournit l'hématocrite.

2.8. Evaluation de la fluidité membranaire par mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH

La technique de mesure de polarisation de sondes fluorescentes logées dans des membranes biologiques ou artificielles (Shinitzky *et al* . 1978) a fourni un outil très abondamment utilisé permettant d'obtenir des informations sur l'état de la fluidité membranaire (pour revue, voir Stolz J.F.*et al* . 1985).

i) Principe

La sonde la plus fréquemment utilisée est le DPH (1,6-diphényl- 1,3,5-hexatriène), un fluorophore apolaire symétrique qui va se loger dans la région hydrophobe de la fraction lipidique de la membrane. Après

monochromatique polarisée et l'intensité de fluorescence émise parallèlement ($I_{0,0}$) et perpendiculairement ($I_{0,90}$) à la source d'excitation est mesurée. Ceci permet de calculer l'anisotropie de fluorescence, calculée comme suit:

$$r_s = \frac{I_{0,0} - I_{0,90}}{I_{0,0} + 2I_{0,90}}$$

Il va de soi que dans un milieu parfaitement isotrope, la sonde peut prendre n'importe quelle orientation et donc, $I_{0,0}$ et $I_{0,90}$ sont identiques, et r_s vaut alors zéro. Par contre, dans un milieu parfaitement anisotrope où la sonde n'a aucune liberté de mouvement, $I_{0,90}$ serait égal à zéro et donc, $r_s=1$. Ainsi, si l'environnement de la sonde est modifié, la valeur de r_s varie, indiquant une diminution ou une augmentation de la fluidité membranaire.

ii) Protocole expérimental (Chabanel A. *et al.* 1985 et Schachter D. *et al.* 1982)

Après le traitement à la glutaraldéhyde, les globules rouges sont lavés 3 fois dans un tampon de lavage (phosphate de sodium 8 mM, pH=7,4, additionné de NaCl 145 mM et de KCl 5 mM). Ils sont ensuite resuspendus dans le tampon de lavage à un hématocrite final de 1%. A 5 ml de cette suspension, est ajouté en mélangeant vigoureusement 100 µl de DPH ($7,5 \times 10^{-4}$ M dans l'éthanol) pour obtenir une concentration finale de DPH de

$15 \times 10^{-6} \text{M}$. Les témoins sont préparés de façon identique mais le DPH remplacé par 100 μl d'éthanol. Après incubation sous agitation constante pendant 60 minutes à température de la pièce, les cellules sont lavées 3 fois avec le tampon de lavage. Les globules rouges sont finalement resuspendus à un hématocrite de 0,05% et les mesures de fluorescence sont effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre de marque Shimadzu Modèle RF-540 avec comme longueurs d'onde d'excitation 360 nm et d'émission, 428 nm. A l'émission, sont placés deux filtres, un Corning 3-74 et un Corning 3-75. La largeur des fentes à l'émission et à l'excitation est de 10 nm.

iii) Calcul de l'anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence est calculée à partir de l'équation suivante, où figure un facteur de correction qui tient compte de l'imperfection des systèmes optiques de l'appareil:

$$r_s = \frac{I_{0,0} - GI_{0,90}}{I_{0,0} + 2GI_{0,90}}$$

où r_s représente l'anisotropie de fluorescence, $I_{0,0}$ et $I_{0,90}$ les intensités de fluorescence détectées lorsque les polariseurs d'excitation et d'émission sont orientés respectivement parallèlement et perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. $G = I_{90,00} / I_{90,90}$ représente le facteur de correction qui tient compte du fait que l'instrument ne transmet pas de façon égale la lumière

compte du fait que l'instrument ne transmet pas de façon égale la lumière émise par les polariseurs d'excitation et d'émission lorsque ceux-ci sont en position 0° et 90° .

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Etude morphologique de l'ingestion de globules rouges par *Entamoeba histolytica*

3.1.1. Mise en évidence de deux types de phagocytose en microscopie optique

L'étude en microscopie optique de l'interaction amibe-globule rouge (figures 9 à 12) révèle que l'adhésion entre l'amibe et la cellule cible (l'érythrocyte ou le "ghost" suivant le cas) se produit immédiatement après la mise en contact des deux cellules (figure 9). Une douzaine de globules rouges peuvent venir se fixer sur chaque trophozoïte, et former une rosette (figure 9).

L'ingestion de l'érythrocyte, qui débute quelques secondes après le contact entre les cellules se produit suivant deux processus bien distincts (figure 10).

1) Le premier processus est une phagocytose classique au cours de laquelle l'amibe vient englober le globule rouge entier ou tout au moins un très gros fragment (figure 10 a). Ce type d'ingestion génère des vacuoles digestives peu nombreuses et dont la taille est analogue à celle de la cellule absorbée.

Figure 9 : Formation d'une rosette par l'adhésion de globules rouges à l'amibe

Les globules rouges qui adhèrent à l'amibe, ici huit, forment, une rosette. L'observation est faite 10 minutes après la mise en présence des amibes et des globules rouges. Les cellules vivantes sont observées en Nomarski.

Barre=10 μ m

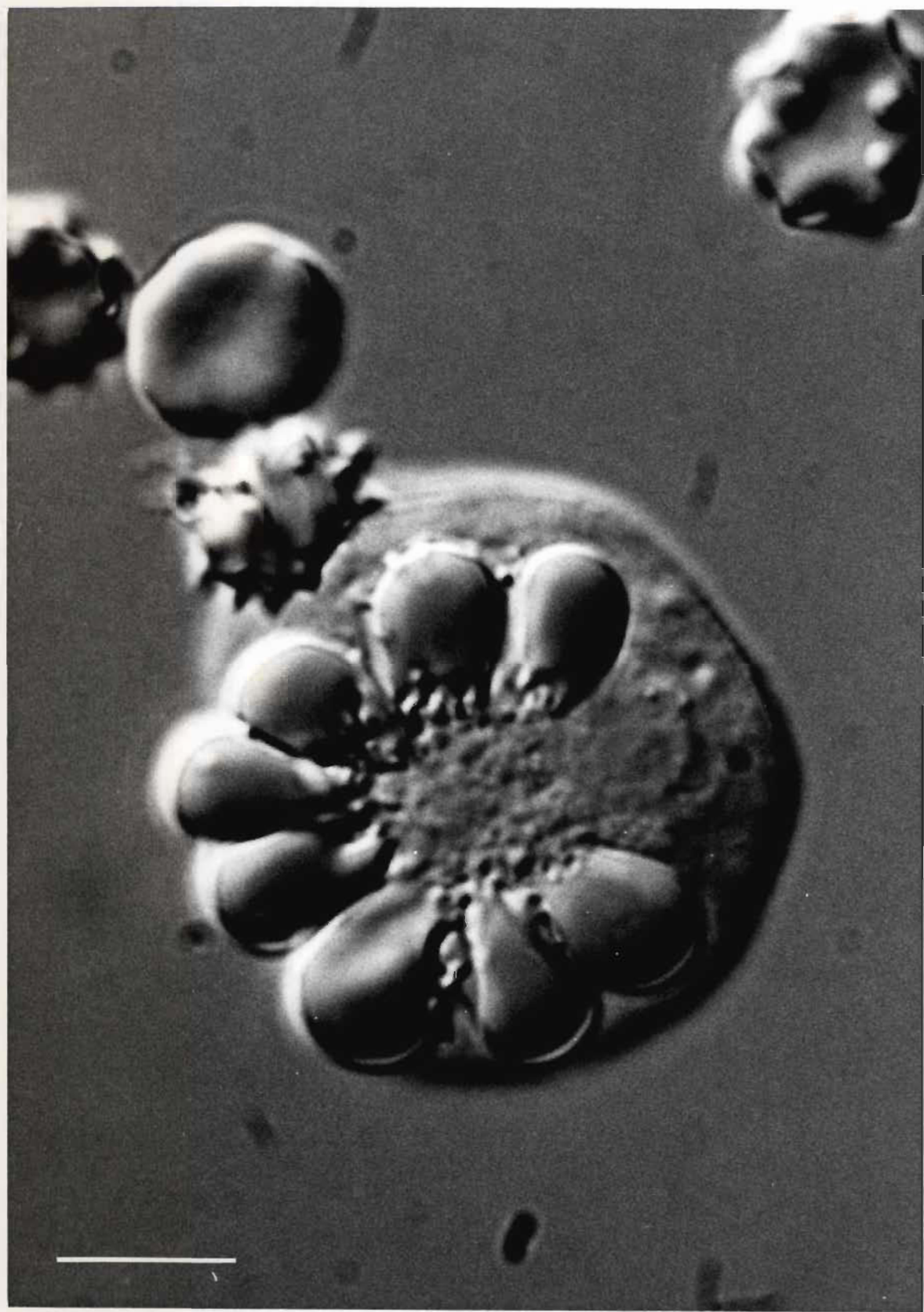


Figure 10: Comparaison en microscopie optique des deux mécanismes de phagocytose

a - L'érythrocyte est absorbé par phagocytose classique, ce qui donne lieu à la formation d'une grande vacuole digestive. (Optique de Nomarski).

Barre = 10µm

b - L'érythrocyte est ingéré par succion ou microphagocytose. La cellule est "aspirée" dans un long canal étroit dont l'extrémité s'arrondit pour former une petite vacuole digestive. (Optique de Nomarski).

Barre = 10µm

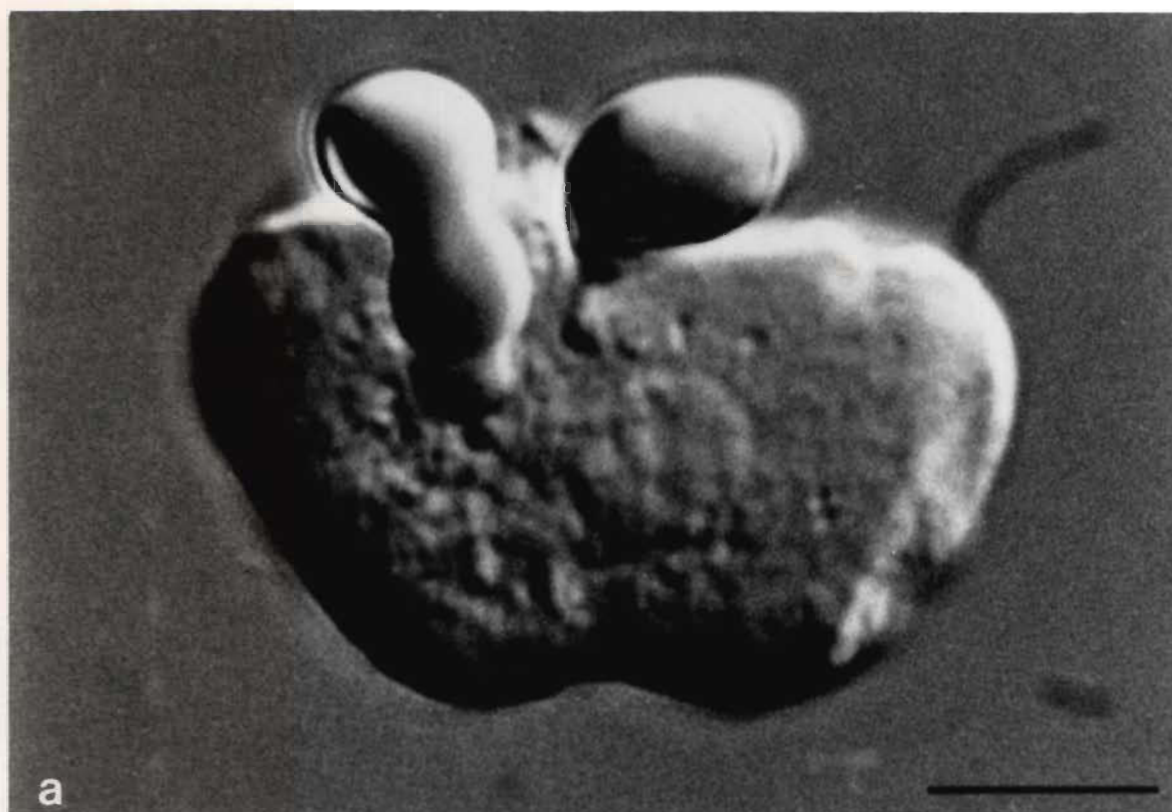


Figure 11 : Microphagocytose simultanée de quatre globules rouges

Quatre globules rouges situés côte à côte sur l'amibe sont ingérés simultanément par microphagocytose. On distingue nettement trois canaux de succion et à l'extrémité de l'un d'eux une vacuole en formation (flèche). (Optique de Nomarski).

Barre = 10 μm

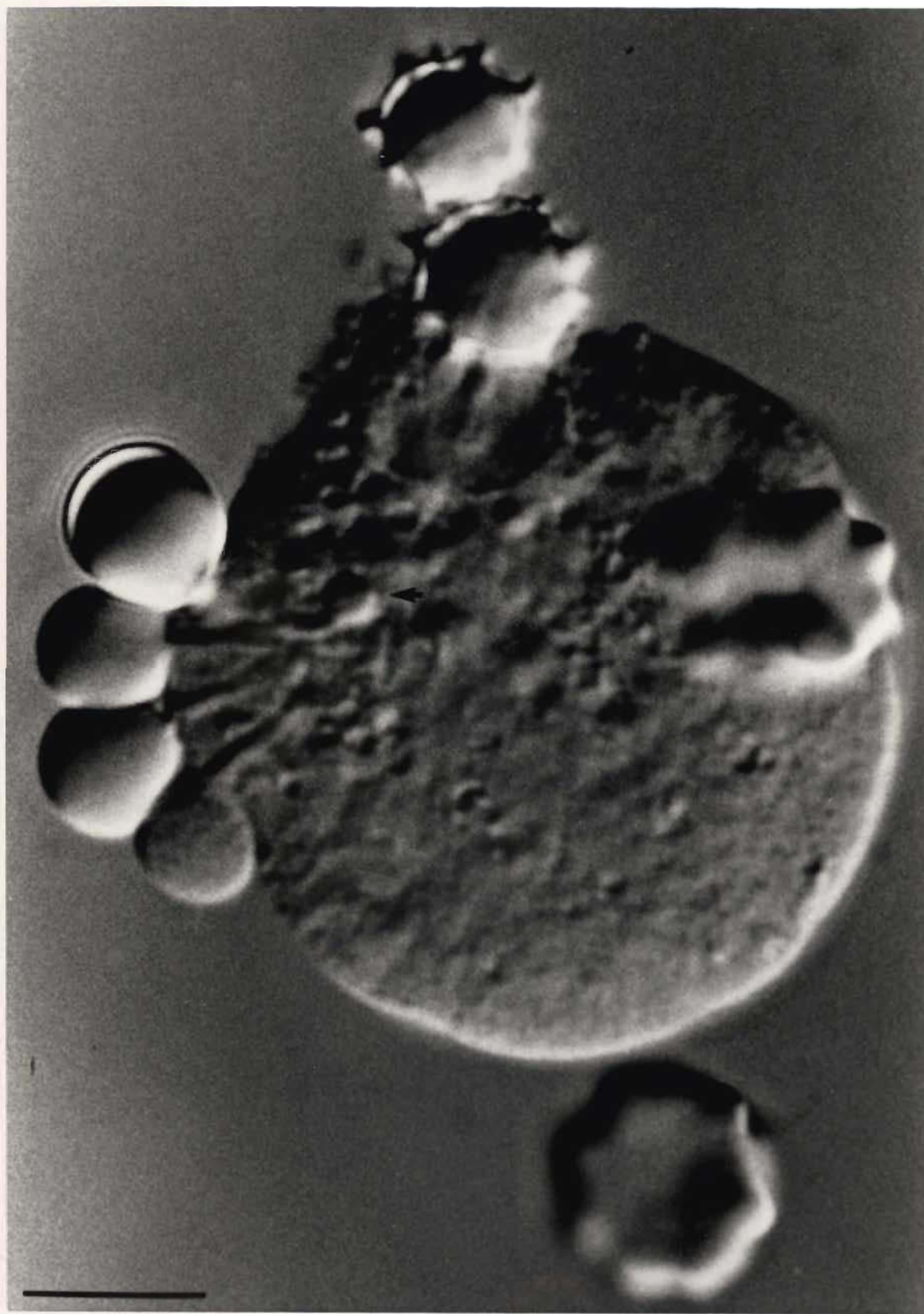
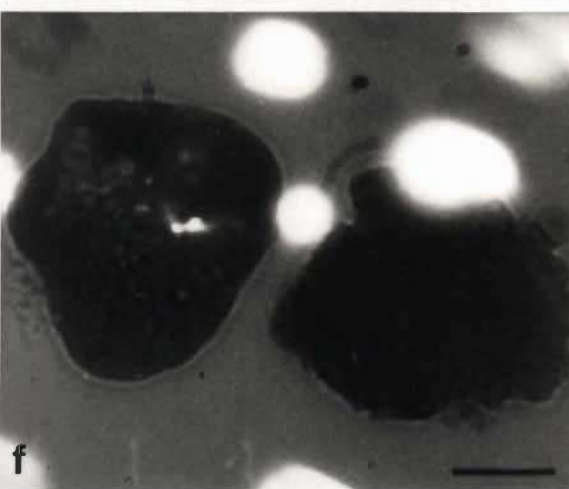
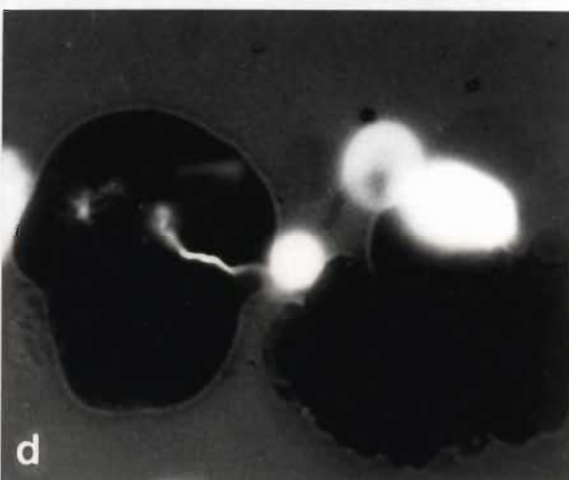
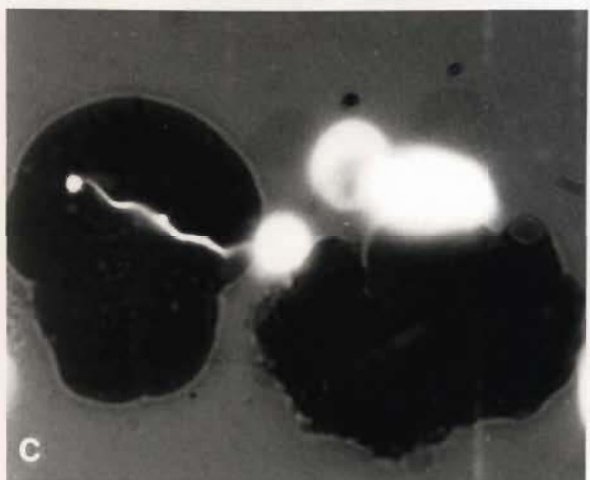
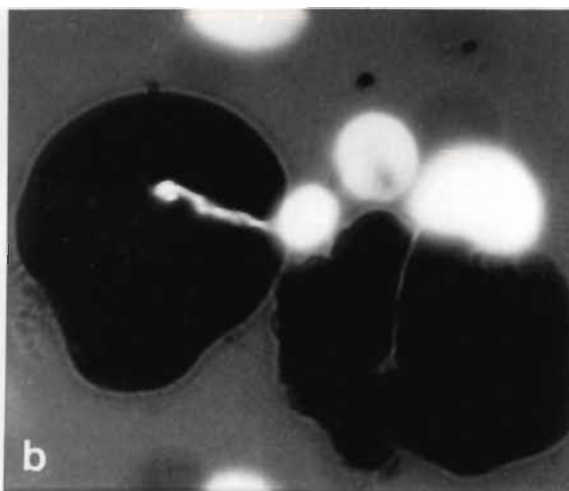
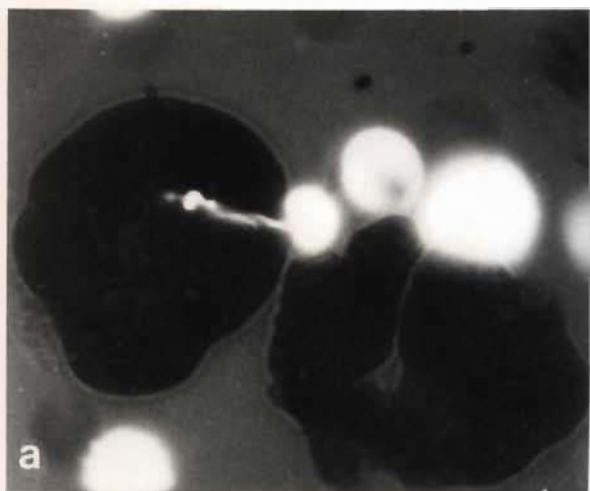


Figure 12: Clichés successifs d'une microphagocytose d'un "ghost" chargé de carboxyfluorescéine

L'utilisation de carboxyfluorescéine permet d'obtenir une très bonne visualisation du phénomène, car le contraste est très grand. Sur les clichés, de **a** à **c** on voit le canal qui s'étire. En **d**, il y a rupture de la membrane du "ghost", et perte de la fluorescence en **e** et **f**. Les clichés sont pris à un intervalle de temps d'environ 10 secondes. (Contraste de phase et fluorescence).

Barre = 10 μ m



2) Le deuxième mode d'ingestion est morphologiquement très différent du précédent (figure 10 **b**). Le globule rouge semble être aspiré par succion à travers un long canal étroit de $1\mu\text{m}$ de diamètre et ayant jusqu'à $30\mu\text{m}$ de long. Ainsi que le montre la figure 11, plusieurs globules rouges peuvent être ingérés de façon simultanée par ce processus dont le résultat est la formation d'un grand nombre de petites vacuoles digestives.

L'utilisation de "ghosts" chargés de carboxyfluorescéine permet d'obtenir une meilleure visualisation de l'ingestion par succion. Sur la figure 12 qui est une succession de clichés d'une même amibe qui ingère un globule rouge, on observe très nettement l'élongation progressive du canal, suivie d'une disparition subite de la fluorescence. Cette extinction de la fluorescence correspond à une fuite de la carboxyfluorescéine dans le milieu suite à la rupture de la membrane du "ghost".

Nous avons nommé ce type de phagocytose par succion "microphagocytose" afin de le distinguer de l'autre mode de phagocytose que nous appellerons phagocytose classique puisqu'elle ressemble au schéma habituellement décrit de la phagocytose (voir Introduction, figure 3). Dans nos observations, plus de 90% des globules rouges normaux, ingérés par *Entamoeba histolytica*, le sont par microphagocytose.

3.1.2. Etude par microscopie électronique des deux types de phagocytose d'érythrocytes par *Entamoeba histolytica*

3.1.2.1. Microphagocytose

La microscopie électronique nous permet de mettre en évidence les détails du phénomène (figures 13 à 17). Les figures 13 à 16 nous montrent la succession d'évènements de la microphagocytose.

La figure 13 montre que le premier contact qui s'établit entre l'amibe et le globule rouge se limite à une petite surface. Cependant, très rapidement, dans cette zone, la membrane de l'érythrocyte se déforme et se replie très fortement. A proximité de ces replis, on constate la présence d'une structure allongée dont le matériel dense, de nature très différente de celle de l'érythrocyte, montre qu'il s'agit d'extensions émises par l'amibe, des filopodes. C'est d'ailleurs au niveau de ces filopodes que les replis de la membrane du globule rouge sont les plus importants, ce qui suggère fortement qu'ils joueraient un rôle direct dans ces déformations.

Le globule rouge est alors aspiré dans un canal (figure 14) qui s'étire de plus en plus (figures 15 et 16). Ce canal est, comme on le constate sur les figures 14, 15 et 16 une invagination de la membrane de l'amibe qui se forme dans la zone de contact avec l'érythrocyte. On note ici aussi la présence de filopodes.

Figure 13 : Début de la microphagocytose

Le contact entre l'amibe et le globule rouge s'établit sur une petite portion de ce dernier. Dans cette zone de contact, la membrane de l'érythrocyte subit déjà de fortes déformations avec formation de replis dans lesquels on note la présence de structures allongées de nature très différente de celle du globule rouge, qui sont des filopodes de l'amibe (flèches). Dans le trophozoïte on voit des grains de glycogène ainsi que des vacuoles digestives contenant des débris divers.

Barre = 1 μ m



Figure 14 : Ebauche du canal de microphagocytose

Au niveau du globule rouge (**A**) on assiste à la formation du canal de succion qui est une invagination de la membrane de l'amibe. La membrane du globule rouge s'étire et les replis s'intensifient. On note ici aussi la présence de filopodes (flèche) dans la zone de contact entre l'amibe et l'érythrocyte. Dans le cytoplasme de l'amibe on aperçoit le noyau (**N**).

Dans les replis de la membrane du globule rouge (**B**) situé à côté du globule rouge (**A**) des filopodes sont présents. Cet érythrocyte (**B**) fortement déformé, est soit à la phase d'adhésion avec l'amibe, soit en phase d'ingestion. Dans ce cas, le canal de microphagocytose étant en dehors du plan de coupe n'est pas visible.

Barre = 1 μm

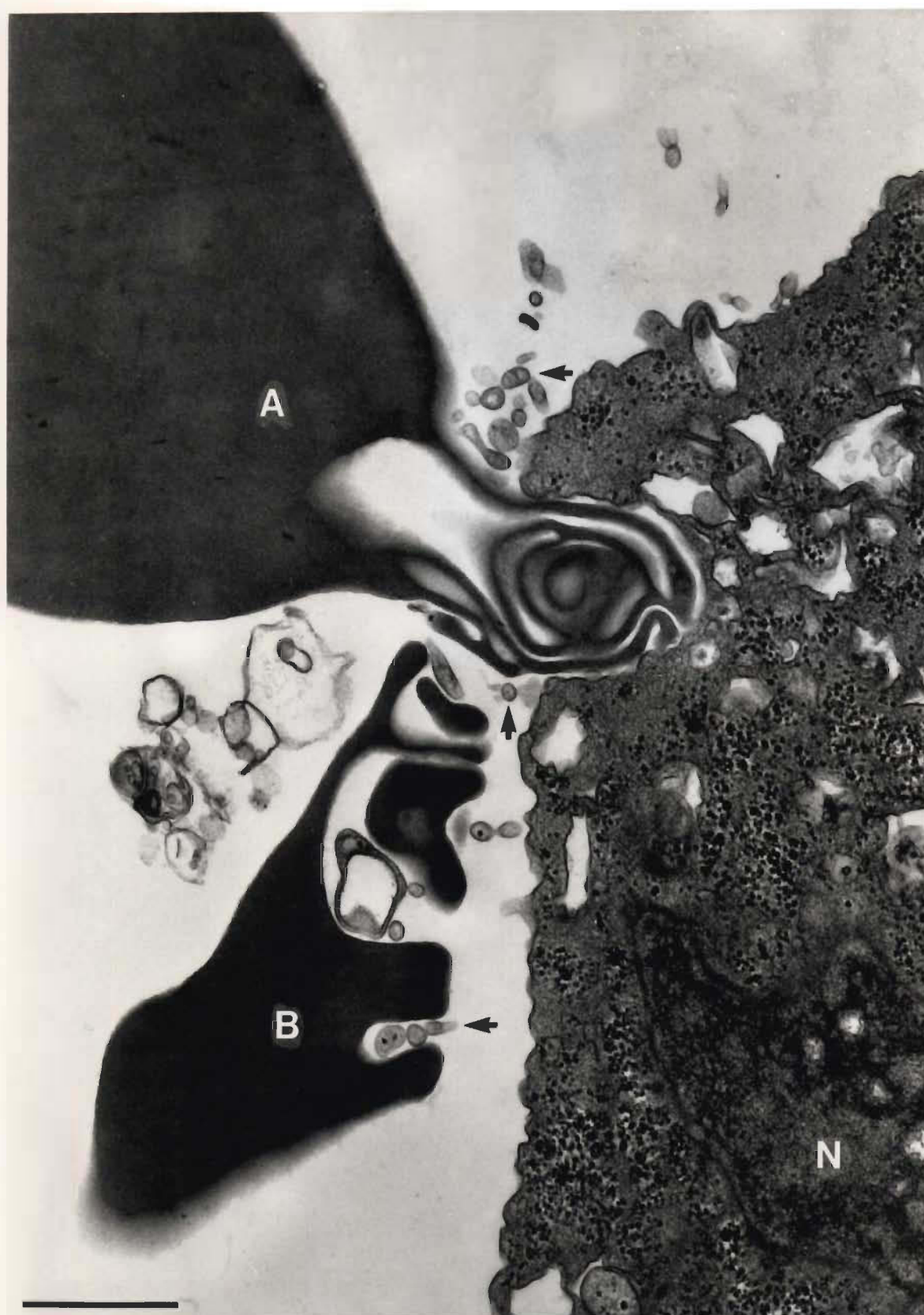


Figure 15 : Elongation du canal de microphagocytose

Le canal de microphagocytose s'allonge, les replis de la membrane du globule rouge s'accroissent, et on assiste à l'ébauche d'une vésicule à l'extrémité du canal. Des filopodes sont visibles en coupe transversale (flèche). De nombreuses vacuoles digestives contenant des débris divers sont présentes dans le cytoplasme de l'amibe.

Barre = 1 μ m



Figure 16 : Formation de la vésicule de microphagocytose

Le canal de microphagocytose est fortement allongé et à l'extrémité une vésicule est en formation s'individualise. Dans le canal, la membrane du globule rouge présente de très nombreux replis et on note encore la présence de filopodes (flèche ➡).

Un deuxième canal de microphagocytose, observé cette fois en coupe transversale, est présent dans l'amibe. Il est entouré d'un matériel dense (flèche ➞) probablement composé de protéines contractiles. Dans le cytoplasme de l'amibe de nombreuses vacuoles digestives sont présentes et on aperçoit le noyau (N).

Barre = 1µm



Figure 17 : Coupe dans un canal de microphagocytose

On observe ici une coupe transversale dans un canal de microphagocytose. Il faut noter les replis de la membrane du globule rouge, les filopodes ainsi que la couche de matériel dense fort probablement constituée d'actine et entourant le canal.

Barre = 1 μ m



Le cytoplasme de l'amibe qui est situé autour des canaux de succion est formé d'un matériel dense particulièrement bien visible sur les figures 16 et 17. Ce matériel est fort probablement constitué de protéines contractiles et en particulier d'actine, dont plusieurs auteurs ont montré le rôle indispensable lors l'ingestion (Ravdin J.I. *et al.* . 1981, Kobiler D. *et al.* 1981a-b, Lopez Revilla R. 1982, Bailey G.B. *et al.* . 1985)

Au cours de l'étirement du canal, son extrémité s'arrondit. Si on compare la figure 16 et la figure 10 **b** prise en microscopie optique on voit clairement l'analogie entre les deux images. La microscopie électronique permet cependant de mettre en évidence les nombreux replis de la membrane du globule rouge. L'ingestion s'achève par la production d'un grand nombre de petites vacuoles digestives d'environ 1µm de diamètre contenant des fragments de la membrane de l'érythrocyte.

3.1.2.2. Phagocytose classique

L'observation des phagocytoses classiques en microscopie électronique (figures 18, 19, 20, 21) permet de voir immédiatement les différences qui existent entre ce mode d'ingestion et la microphagocytose. L'aspect le plus frappant est la très faible déformation que subit la membrane du globule rouge lors de ce mode d'ingestion.

La figure 18 permet la visualisation des différentes étapes successives de

Figure 18 : Phagocytose classique

Le contact qui s'établit entre l'amibe et le globule rouge (**A**) se fait sur une grande surface de ce dernier. On constate dans cette zone une légèrement vacuolisation de l'érythrocyte. Un très gros fragment d'érythrocyte (**B**) est englobé par le pseudopode de l'amibe. Aucune déformation de sa membrane n'est observable. Au centre de l'amibe une très grosse vacuole digestive (**V**) est présente. Elle contient un gros fragment d'érythrocyte intact. Dans le cytoplasme de l'amibe on observe d'autres vacuoles digestives contenant des débris divers ainsi que le noyau (**N**).

Barre = 1 μ m

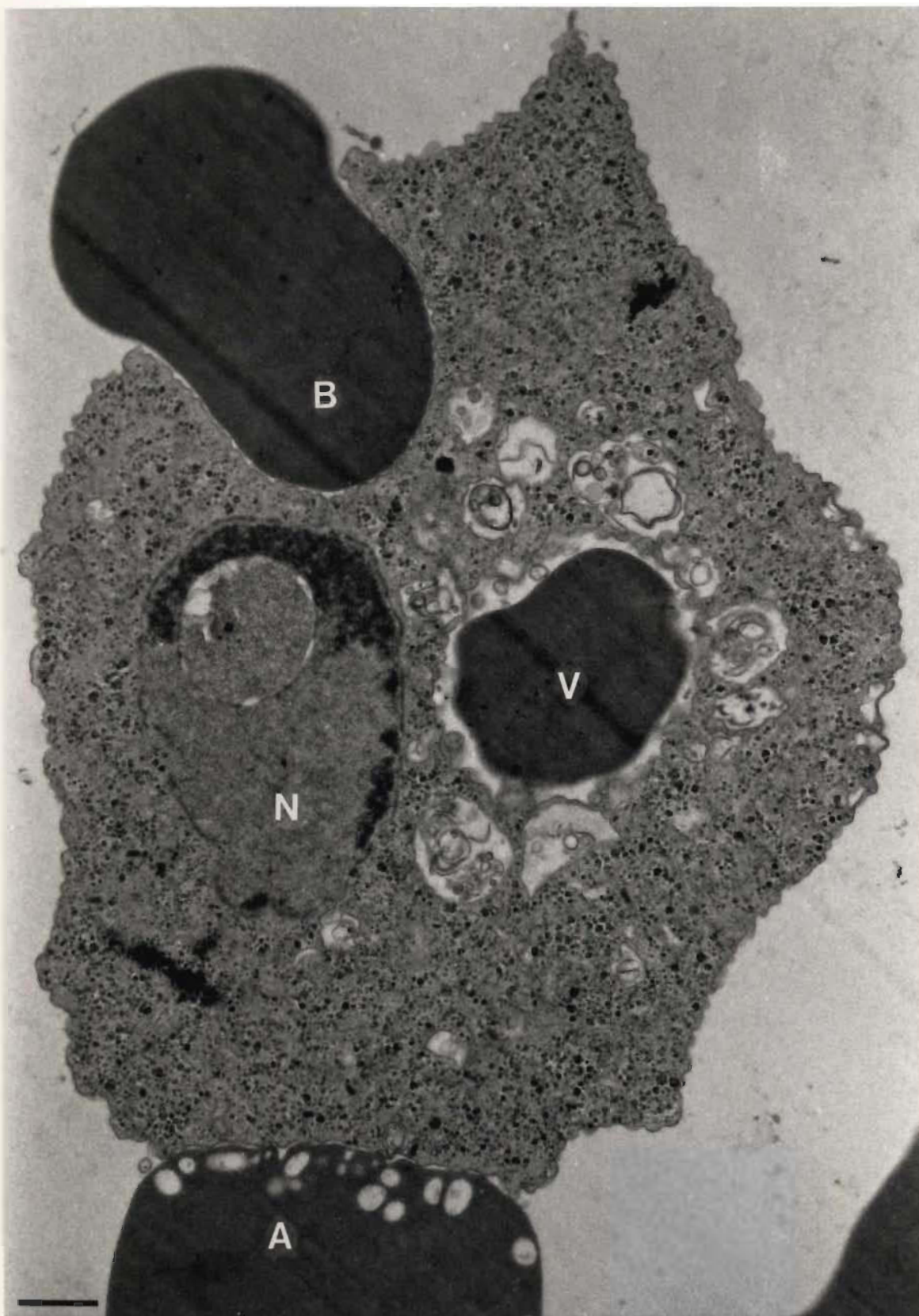


Figure 19 : Déformation de l'érythrocyte lors de la phagocytose classique

Comparée à la microphagocytose, lors de la phagocytose classique la membrane du globule rouge est très peu déformée. Quelques filopodes localisés dans une seule région de l'érythrocyte sont visibles (flèche). Dans le cytoplasme on voit des vacuoles contenant divers débris ainsi que le noyau (N).

Barre = 1 μ m

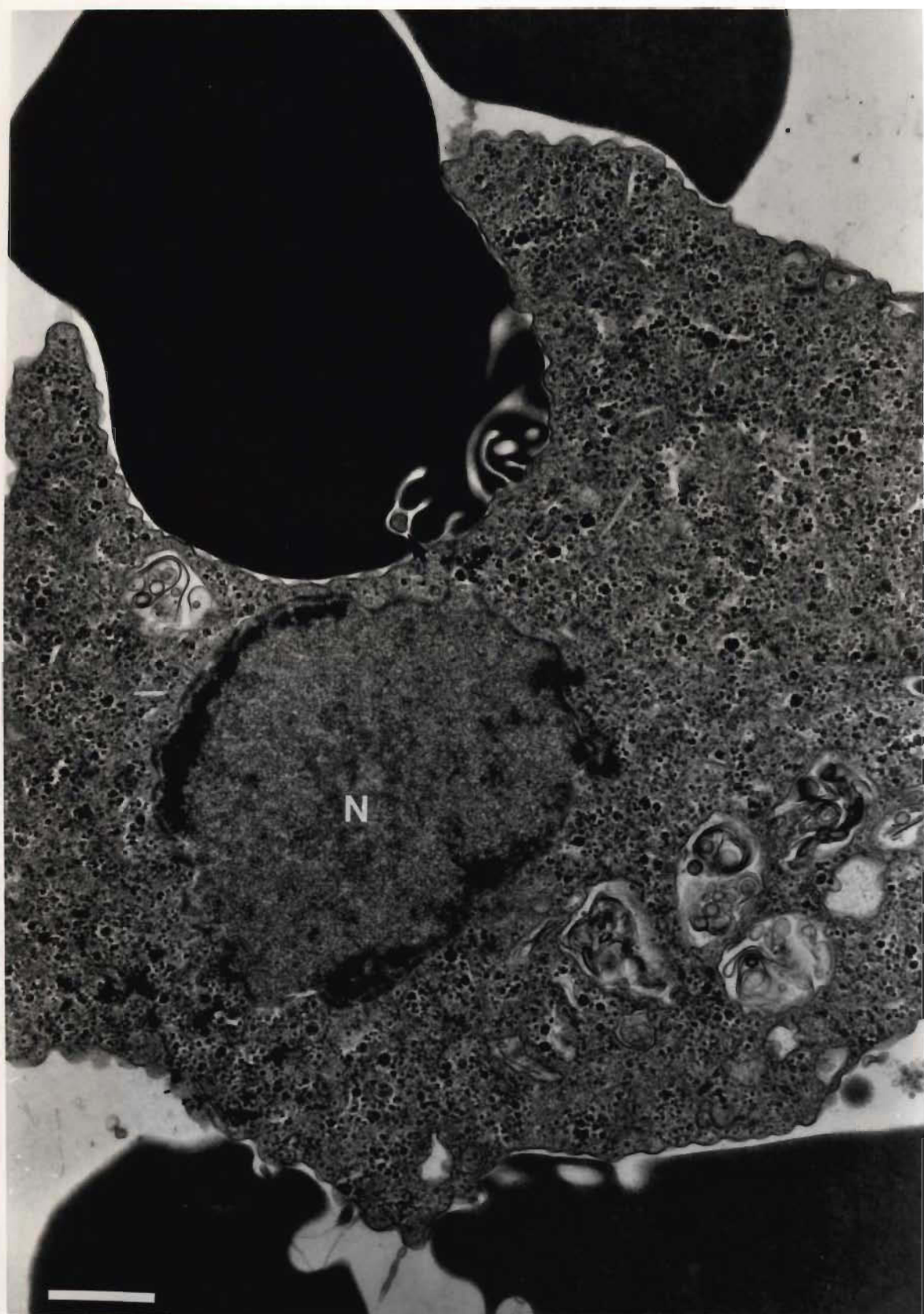


Figure 20 : Couche dense bordant la face interne d'un pseudopode de phagocytose englobant un érythrocyte lors de la phagocytose classique

Un pseudopode de phagocytose dont la face interne est bordée d'une couche dense, probablement constituée de protéines contractiles vient englober le globule rouge qui s'étire. La membrane de l'érythrocyte est très faiblement déformée. De petites vacuoles contenant divers débris sont présentes dans le cytoplasme de l'amibe.

Barre = 1 μ m

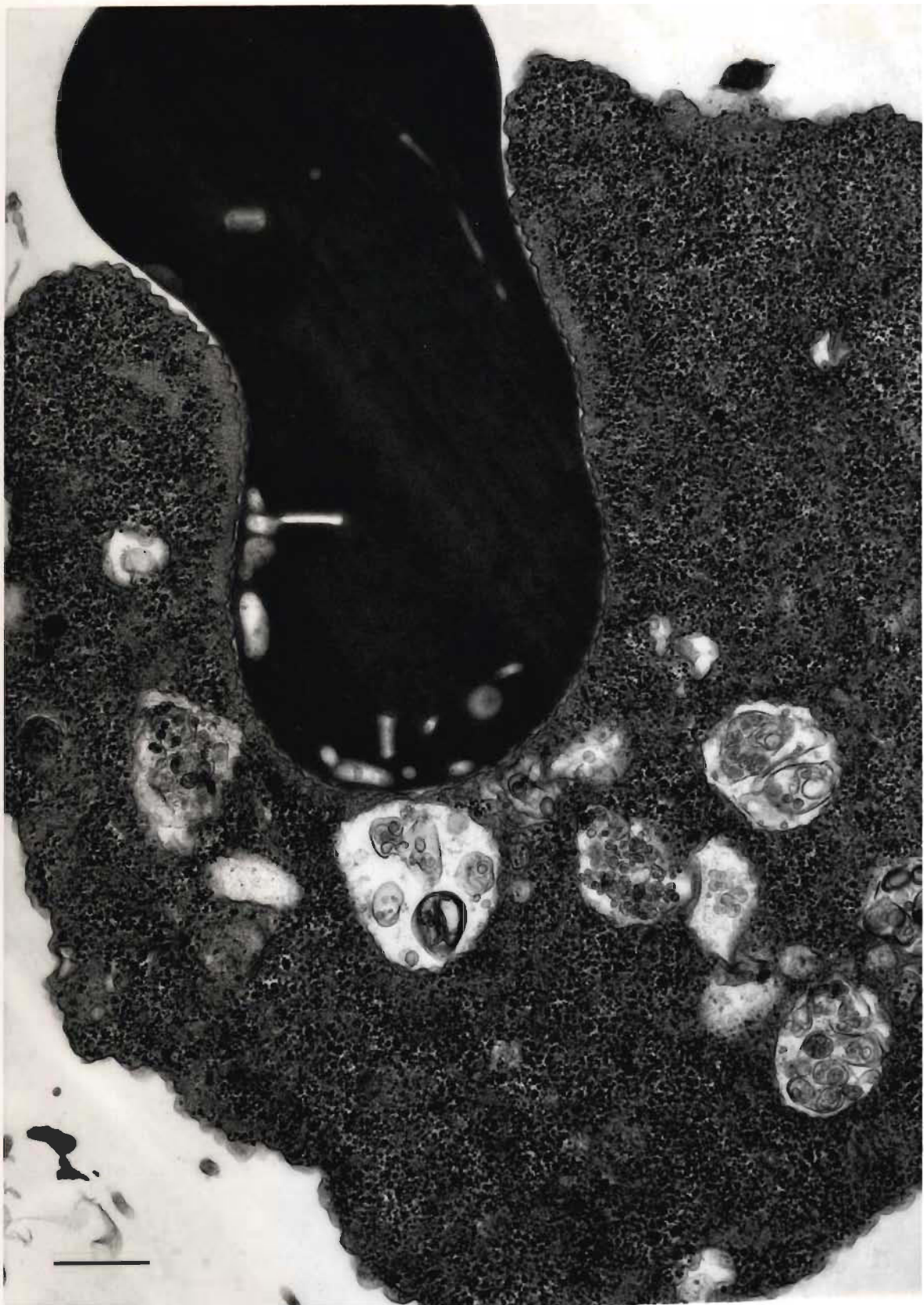
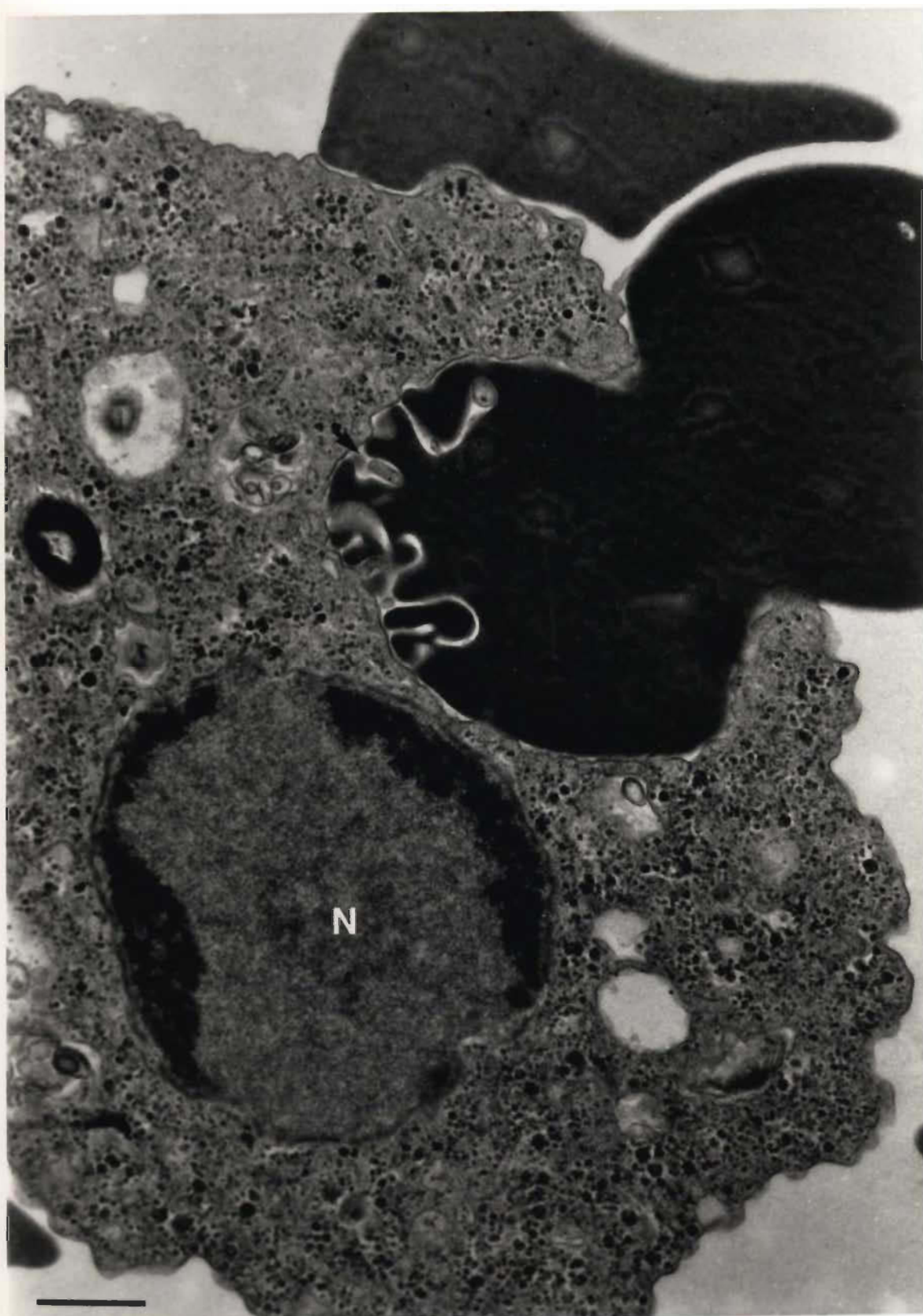


Figure 21 : Ingestion partielle d'un érythrocyte lors de la phagocytose classique

Au cours de l'ingestion le globule rouge va probablement être coupé en deux par le rapprochement des bords de l'amibe. Localement, quelques filopodes sont visibles (flèche). Le noyau de l'amibe (**N**) est bien visible dans son cytoplasme.

Barre = 1 μm



la phagocytose classique. Tout d'abord, le globule rouge **A** subit la première étape de l'ingestion, c'est à dire l'adhésion entre l'amibe et la cellule cible. Cette adhésion se fait sur une large surface de l'érythrocyte. Sur cette figure et de l'autre côté de l'amibe, on voit un stade beaucoup plus avancé de la phagocytose classique où un deuxième globule rouge (**B**) est déjà fortement englobé par l'amibe. Contrairement à ce que l'on observait au cours de la microphagocytose, l'érythrocyte ne présente presque aucune déformation de sa membrane. Au centre du trophozoïte, un important fragment de globule rouge (**V**) est présent dans une structure qui est soit une vacuole digestive, soit une coupe transversale dans une invagination de phagocytose. Quelle que soit la nature exacte de cette structure, le fragment qui y est inclus n'est pas déformé. Dans le cas de la microphagocytose, que l'on soit dans une vacuole digestive ou dans un canal de succion (figure 16), la membrane de l'érythrocyte est très fortement repliée.

Après l'adhésion au globule rouge, l'amibe englobe de plus en plus l'érythrocyte (figures 19, 20). Parfois, le rapprochement des extrémités de l'amibe forme une constriction qui coupe l'érythrocyte en deux (figure 21). Dans certains cas, au niveau de la zone de contact entre l'amibe et le globule rouge, on peut apercevoir des structures allongées analogues à celles observées au cours de la microphagocytose: des filopodes. Ceux-ci sont toujours localisés d'un seul et même côté. C'est à leur niveau que des déformations de la membrane de la cellule cible sont observables. Il semble donc que leur présence soit responsable de ces déformations (figures 19, 21).

Les vacuoles digestives formées par ce mode de phagocytose sont de la taille du globule rouge, ou tout au moins de celle du fragment ingéré. Elles sont donc beaucoup plus grandes que celles formées lors de la microphagocytose (figures 21, 22).

Dans la zone de contact entre l'amibe et le globule rouge, sous la membrane plasmique du pseudopode qui englobe l'érythrocyte, on note la présence d'un matériel dense disposé en une couche fine (figures 18 et 20). Bien que cette couche soit beaucoup moins épaisse que dans le cas de la microphagocytose, elle doit probablement être elle aussi constituée de protéines contractiles.

3.1.2.3. Description des vacuoles digestives formées par les deux types de phagocytose

L'ingestion d'un globule rouge par microphagocytose conduit à la formation d'un grand nombre de petites vacuoles digestives contenant les fragments du globule rouge ingéré (figure 23). Par contre, lors de la phagocytose classique, l'ingestion de l'érythrocyte conduit à la formation d'une seule vacuole digestive dont la taille est celle du globule rouge ou tout au moins du fragment ingéré (figure 22).

Les deux modes de phagocytose commencent immédiatement après le contact des amibes et des érythrocytes et, pendant plusieurs heures, l'amibe

Figure 22 : Vacuole formée lors de la phagocytose classique

Coupe dans une amibe montrant une grande vacuole contenant un très gros fragment de globule rouge presque intact. De petites vacuoles contenant divers débris sont également présentes.

Barre = 1 μ m

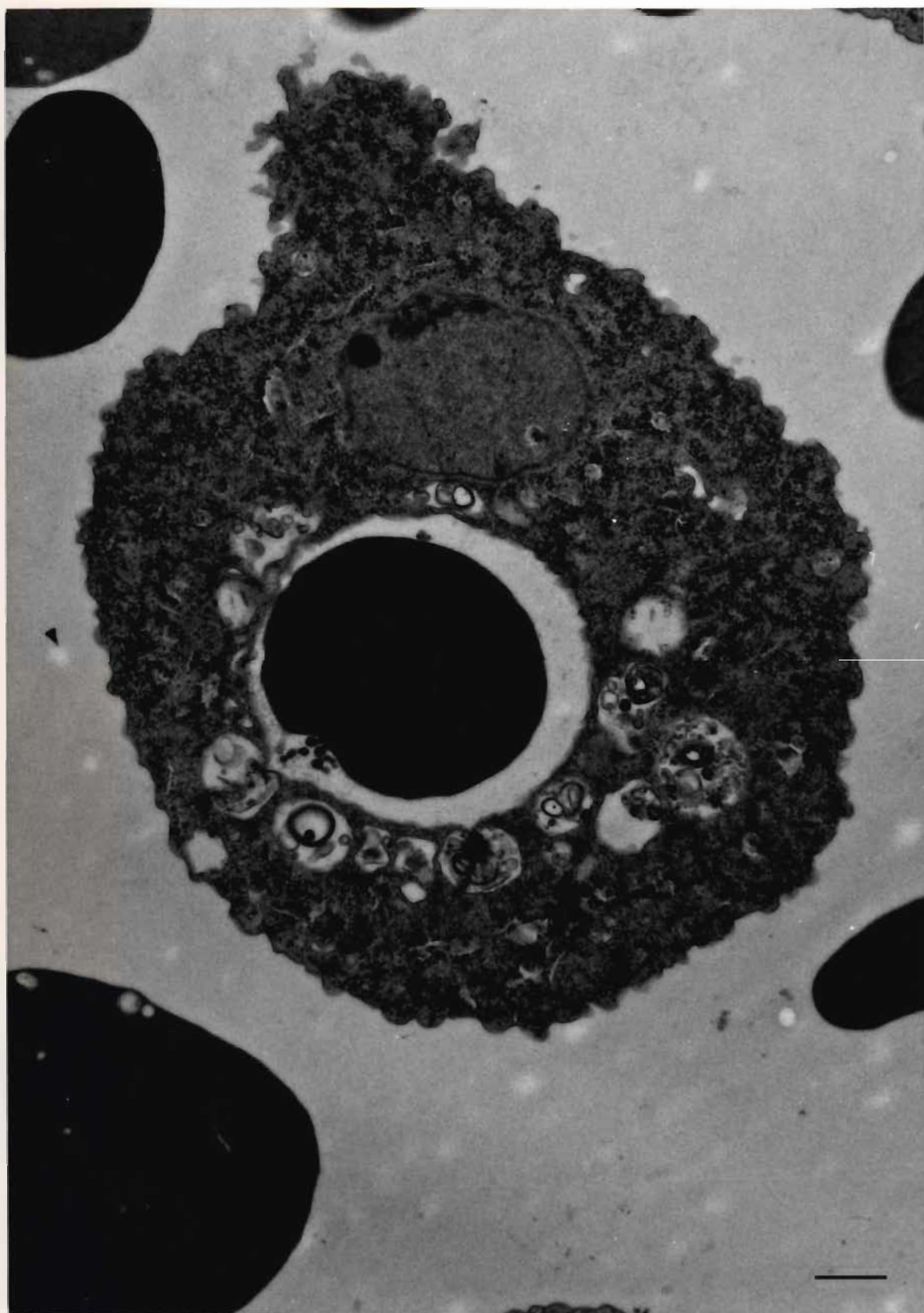
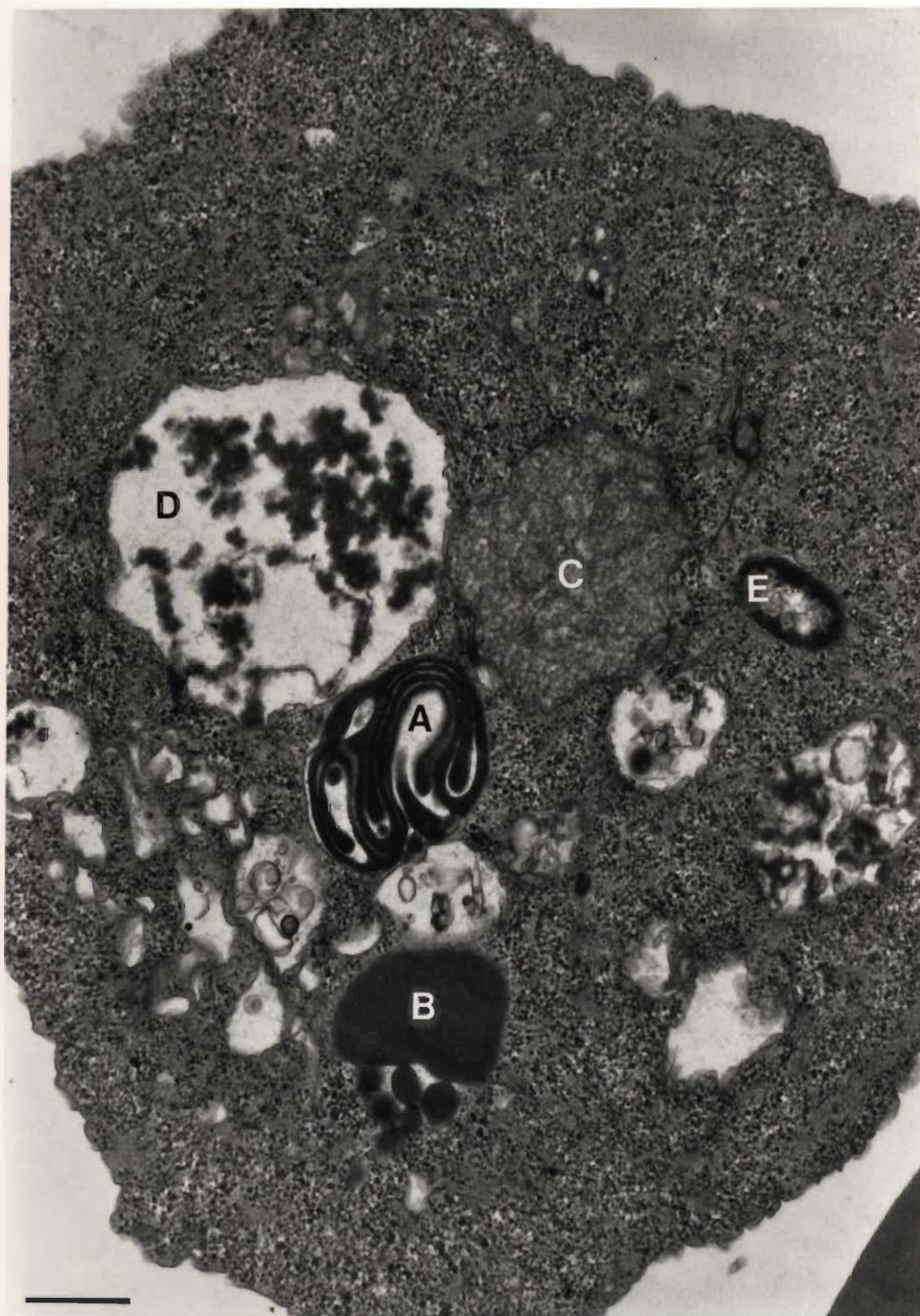


Figure 23 : Morphologie des vacuoles digestives

Plusieurs vacuoles digestives contenant des fragments de globules rouges à divers stades de digestion sont visibles dans le cytoplasme de l'amibe. En **A** et **B** les replis membranaires de l'érythrocyte sont bien visibles. En **C**, la vacuole contient de l'hémoglobine à l'état diffus, alors qu'en **D** elle est sous forme d'amas. En **E**, la vacuole contient une bactérie.

Barre = 1 μ m



peut phagocyter un grand nombre d'érythrocytes. Ainsi, il n'est pas rare de rencontrer des trophozoïtes contenant jusqu'à une dizaine de globules rouges. Ceci permet d'observer dans les amibes un grand nombre de vacuoles digestives contenant des fragments de globules rouges à divers stades de digestion (figure 23). Dans les vacuoles **A** et **B** de la figure 23 on reconnaît clairement des fragments d'érythrocyte. En **A** les replis membranaires de ce dernier sont particulièrement bien visibles. En **C** l'hémoglobine est à l'état diffus, alors qu'en **D** elle forme des agrégats. En **E** on voit une bactérie et dans les vacuoles restantes, des débris divers difficilement identifiables.

3.1.2.4. Phagocytoses de type intermédiaire

Entre ces deux modes de phagocytose extrêmes que sont la microphagocytose et la phagocytose classique représentés respectivement sur les figures 13 à 17 et 18 à 22., il existe aussi des phagocytoses d'un type intermédiaire qu'il est difficile de classer dans l'une ou l'autre de ces deux catégories.

En effet, tel qu'on peut le voir sur les figures 24 et 25, un même globule rouge est ingéré par un mode de phagocytose intermédiaire. La figure 24 montre que dans le cas de l'érythrocyte **A**, l'amibe opère à son ingestion par deux mécanismes différents. Le fragment du globule rouge le plus profondément absorbé par l'amibe, est très fortement déformé comme dans le

cas d'une microphagocytose alors que l'autre fragment non déformé, est situé dans une large invagination de la membrane de l'amibe, telle une phagocytose classique. A côté de ce globule rouge **A**, un autre **B** est ingéré par microphagocytose. Sur la figure 25 nous voyons à nouveau le même phénomène où l'érythrocyte **A** est ingéré par une phagocytose classique, alors que l'érythrocyte **B** est absorbé par microphagocytose. Ces deux images montrent de façon éloquente que dans certains cas l'ingestion est une combinaison des deux processus extrêmes, la microphagocytose et la phagocytose classique.

3.1.2.5. Discussion de l'étude morphologique de la phagocytose de globules rouges par *Entamoeba histolytica*

La plupart des études antérieures portant sur la phagocytose de globules rouges par *Entamoeba histolytica* sont des études quantitatives qui consistaient à compter le nombre d'érythrocytes ingérés par l'amibe. Dans ces expériences, les globules rouges en excès ou adhérant à l'amibe étaient éliminés par choc osmotique, ce qui empêchait toute analyse morphologique du phénomène puisque les cellules en cours d'ingestion étaient détruites (Trissl D. *et al* . 1978a-b, Orozco E. *et al* . 1982, 1983, 1985).

Grâce à notre technique, qui consiste à éliminer l'excès de globules rouges non ingérés par lavage, ce qui préserve les érythrocytes, nous avons montré clairement, par microscopie optique et électronique, qu'*Entamoeba*

Figure 24 : Phagocytose intermédiaire

La portion du globule rouge **A** la plus profondément englobée par l'amibe est déformée comme dans le cas d'une microphagocytose alors que l'autre portion non déformée est située dans une large invagination de la membrane de l'amibe comme dans le cas de la phagocytose classique. Le globule rouge **B** subit une microphagocytose. Un grand nombre de vacuoles digestives contenant divers débris sont visibles dans le cytoplasme de l'amibe. N=noyau.

Barre = 1 μ m

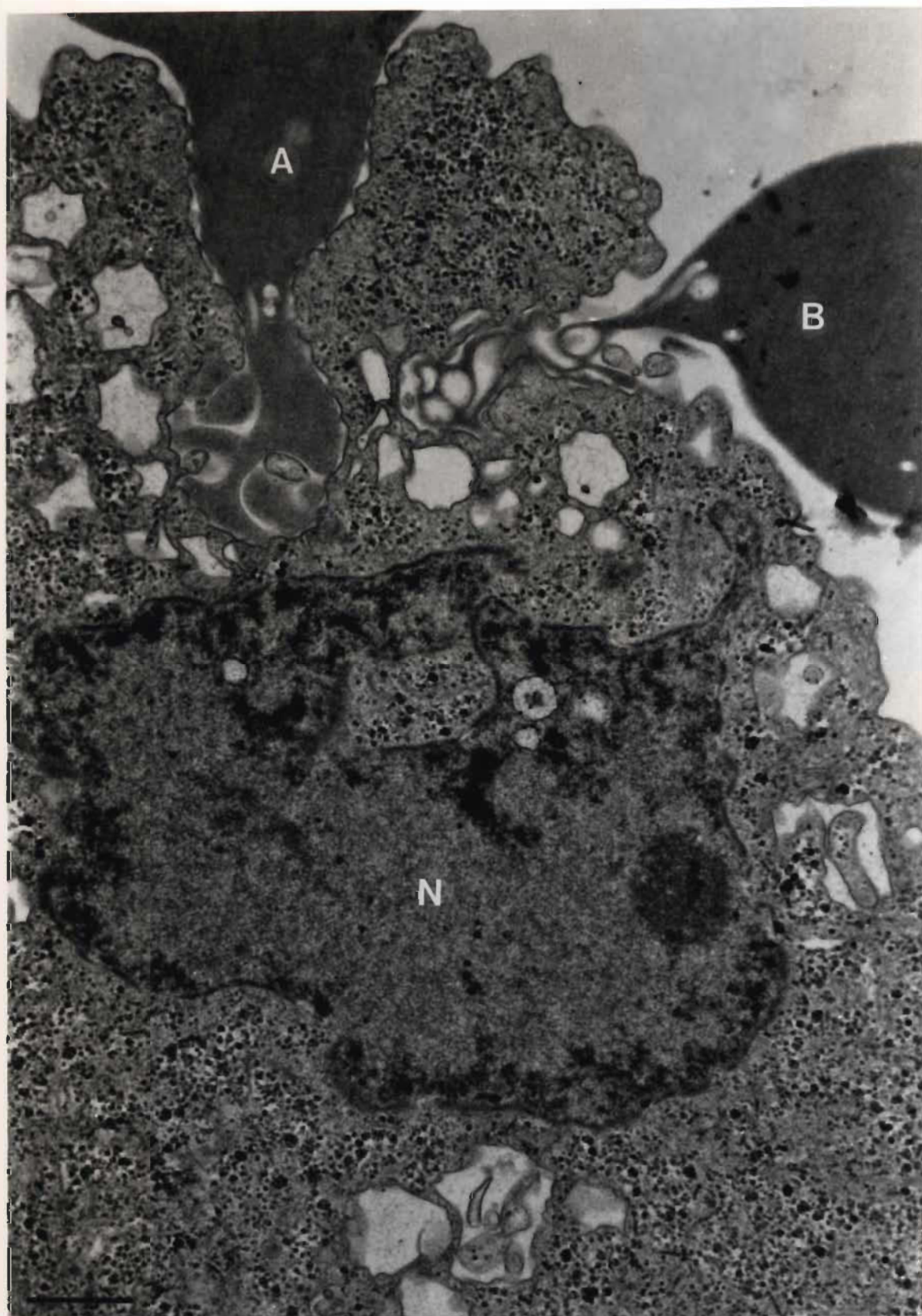


Figure 25 : Phagocytose intermédiaire d'un globule rouge ayant perdu une partie de son hémoglobine

Le globule rouge **A** qui a perdu une grande partie de son hémoglobine, subit une phagocytose de type intermédiaire. La portion la plus profondément ingérée par l'amibe est fortement déformée, alors que l'autre l'est très peu et est située dans un élargissement de l'invagination de la membrane de l'amibe. Le globule rouge **B** est ingéré par microphagocytose. Des vacuoles digestives de petite taille contenant des débris divers sont visibles dans le cytoplasme de l'amibe.

Barre = 1 μ m



histolytica est capable d'ingérer les globules rouges par deux processus différents, que nous avons nommés phagocytose classique, en raison de sa ressemblance au schéma habituel de la phagocytose, et microphagocytose, en raison du fait que ce mécanisme, qui ressemble à une succion, conduit à l'absorption, par l'amibe, de petits fragments. En fait, plus de 90% des globules rouges sont ingérés par microphagocytose et moins de 10% le sont par phagocytose classique.

En 1985, E. Orozco *et al.* ont montré qu'une souche d'*Entamoeba histolytica* (la souche HM1:IMSS) était constituée de différentes sous-populations d'amibes possédant des pouvoirs de phagocytose différents. Il est donc possible que les différents modes de phagocytose que nous avons observés en microscopie soient une manifestation morphologique d'un tel phénomène, à savoir que la souche que nous utilisons pourrait être constituée de différentes sous populations d'amibes, ayant des modes de phagocytose différents.

Cependant, la figure 26 montre qu'une même amibe peut phagocyter deux globules rouges différents suivant deux mécanismes. La même chose est aussi observée sur la figure 27 où une coupe dans une vacuole contenant des replis membranaires d'érythrocyte indique que l'amibe a ingéré un globule rouge par microphagocytose alors qu'une autre vacuole contient un globule rouge entier qui n'a pu être absorbé que par phagocytose classique. Ces observations montrent clairement que notre souche d'amibes ne contient pas plusieurs sous populations dont le mécanisme de phagocytose serait

Figure 26 : Deux modes de phagocytose différents présents sur une même amibe, dont celle d'un érythrocyte ayant perdu une partie de son hémoglobine

Le globule rouge (A) est absorbé par phagocytose classique alors que l'érythrocyte (B) est ingéré par microphagocytose.

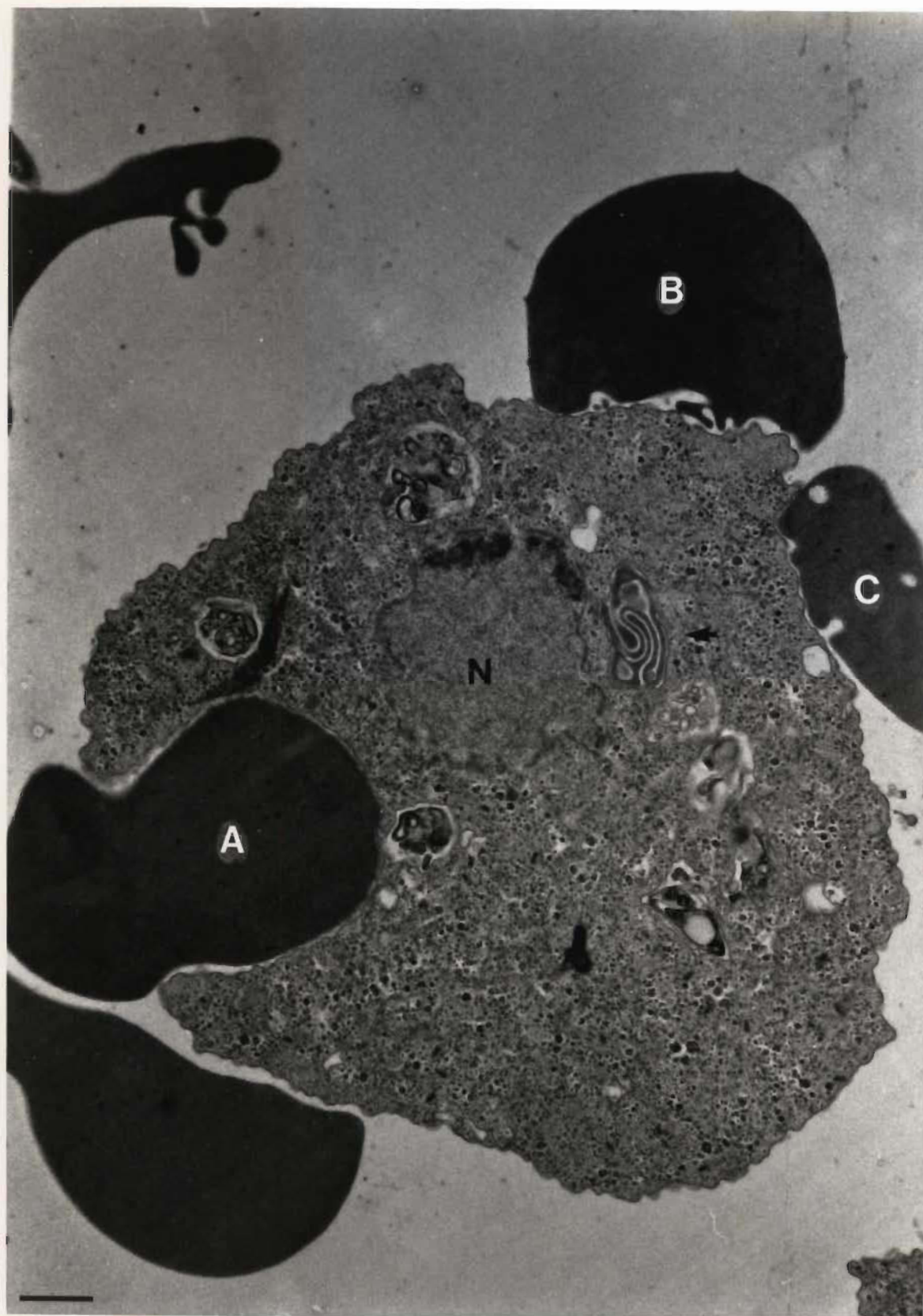
Barre = 1 μ m



Figure 27 : Deux modes de phagocytose différents présents sur la même amibe

Trois érythrocytes (A, B, C) sont en contact direct avec l'amibe. Le globule rouge (A) est ingéré par phagocytose classique. Une coupe dans un canal de microphagocytose (flèche) où l'on voit une membrane de globule rouge fortement repliée indique que l'amibe l'a ingéré par microphagocytose. On note également la présence de vacuoles digestives contenant divers débris dans le cytoplasme de l'amibe. N=noyau.

Barre = 1 μ m



différent. Un autre facteur est donc responsable du mode de phagocytose.

Nous avons alors soulevé une autre hypothèse: puisqu'il existe deux modes de phagocytose qui ne semblent pas liés à l'amibe nous avons pensé que le mode d'ingestion observé pourrait dépendre d'un facteur propre à la cellule cible, et en particulier sa déformabilité. Dans une telle hypothèse, les cellules peu déformables seraient ingérées par phagocytose classique, alors que les cellules déformables le seraient par microphagocytose. Dans le sang, la population d'érythrocytes est constituée de cellules d'âge différent. Or la déformabilité des érythrocytes est liée à leurs âges, les cellules jeunes étant beaucoup plus déformables que les cellules âgées. On peut donc imaginer que les microphagocytoses correspondraient à l'ingestion des jeunes globules rouges déformables, et les phagocytoses classiques à celle des vieux érythrocytes peu déformables.

Si la déformabilité de l'érythrocyte est le facteur qui détermine le mode de phagocytose, en modifiant artificiellement la déformabilité on devrait pouvoir induire sélectivement un mode de phagocytose. Dans notre cas plus, de 90% des globules rouges sont ingérés par microphagocytose. Pour vérifier notre hypothèses nous avons fait varier la rigidité des érythrocytes et regarder si celà entraîne une modification du nombre de microphagocytoses et de phagocytoses classiques.

3.2. Phagocytose de globules rouges rigidifiés à la glutaraldéhyde

Afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle la déformabilité de l'érythrocyte serait le facteur qui détermine le mode de phagocytose chez *Entamoeba histolytica* nous avons donné à l'amibe des érythrocytes rigidifiés. Un des agents les plus fréquemment utilisés pour augmenter la rigidité du globule rouge est la glutaraldéhyde. Ce composé a comme effet de ponter les protéines membranaires, celles du cytosquelette, ainsi que l'hémoglobine ce qui provoque une diminution de la déformabilité globale de l'érythrocyte.

Ainsi, en utilisant des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, nous pouvons espérer diminuer progressivement la déformabilité des érythrocytes et voir si une telle modification entraîne une modification du mode de phagocytose de l'amibe.

i) Résultats

Le comptage des différents types de phagocytose (figure 28) en fonction du traitement à la glutaraldéhyde montre que dans le cas des globules rouges non traités, sur 100 amibes rencontrées au hasard on observe en moyenne 55 microphagocytoses et 5 phagocytoses classiques, soit en terme de phagocytoses, 90 % de microphagocytoses et 10% de phagocytoses classiques.

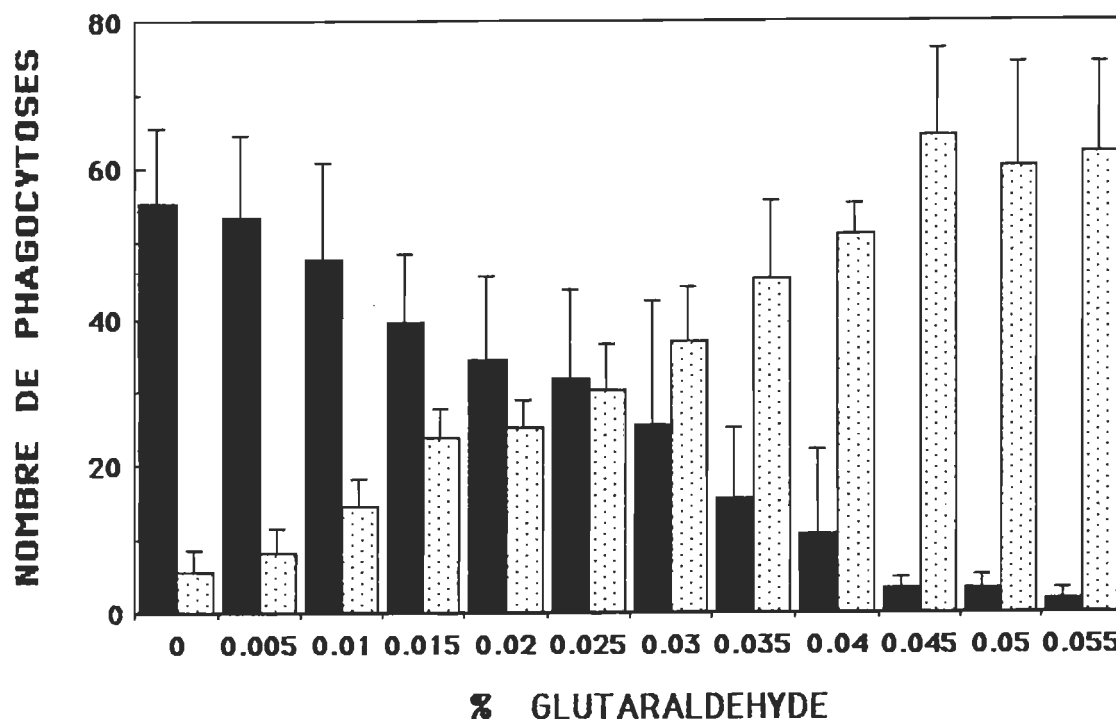


Figure 28 : Moyenne des comptages des différents types de phagocytose en fonction de la concentration en glutaraldéhyde utilisée lors du traitement des globules rouges

■ Microphagocytose

□ Phagocytose classique

Les phagocytoses sont comptées sur 100 amibes rencontrées au hasard. Les moyennes ont été calculées sur 4 expériences faites trois fois.

Lorsque les globules rouges sont traités par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, il y a une diminution du nombre des microphagocytoses et augmentation des phagocytoses classiques. Pour la plus forte concentration de glutaraldéhyde utilisée, soit 0,055%, sur 100 amibes on observe en moyenne 2 microphagocytoses et 62 phagocytoses classiques, ce qui correspond à 97% des phagocytoses de toutes les phagocytoses observées. Pour un traitement des globules rouges par 0,025% de glutaraldéhyde, la moitié des globules rouges sont phagocytés par microphagocytose, l'autre moitié par phagocytose classique. On note également que quelque soit la concentration de glutaraldéhyde utilisée lors du traitement des globules rouges, le nombre total de phagocytoses reste constant.

Pour mieux visualiser comment les deux types de phagocytose sont affectés par la concentration de glutaraldéhyde utilisée lors du traitement des érythrocytes, nous avons porté en graphique le rapport des microphagocytoses et des phagocytoses classiques en fonction de la concentration de glutaraldéhyde. Les résultats sont présentés à la figure 29. On y voit que le rapport, microphagocytoses versus phagocytoses classiques diminue de façon exponentielle pour des concentrations croissantes de glutaraldéhyde utilisées lors du traitement des érythrocytes. Ainsi, pour une concentration de glutaraldéhyde de 0,025 %, le rapport des deux modes d'ingestion est égal à 1.

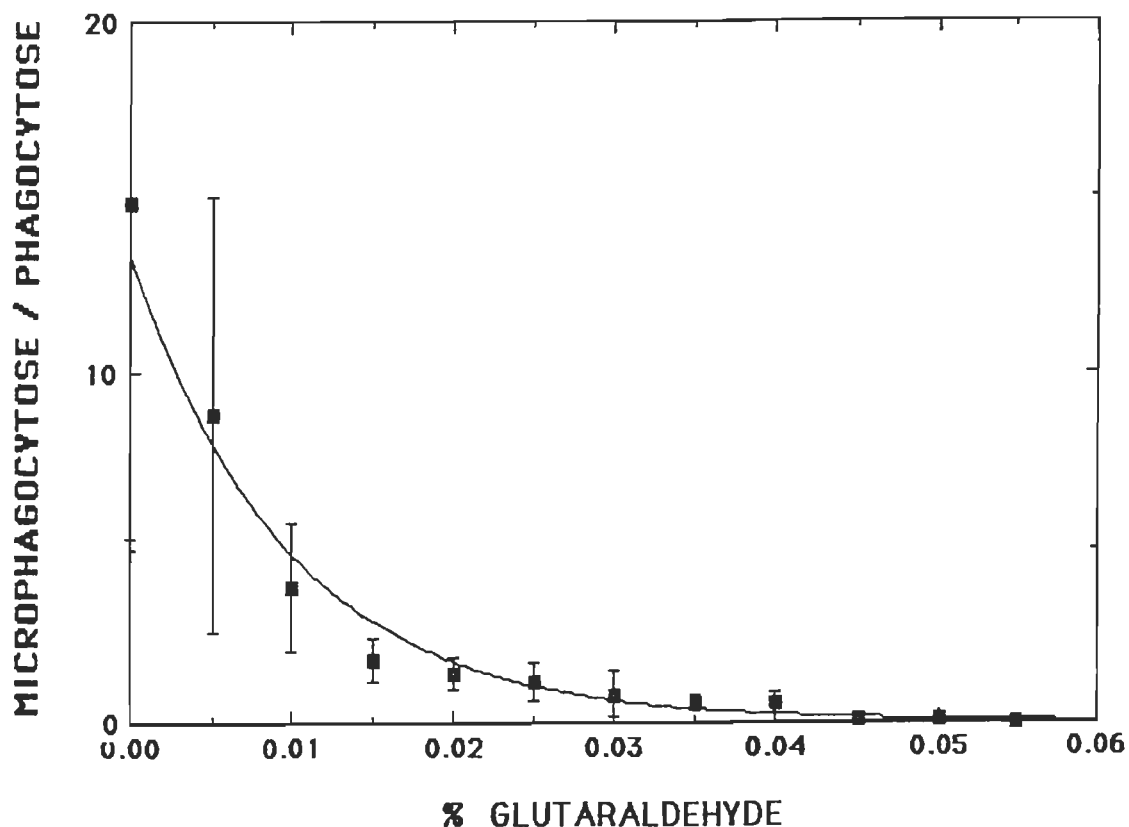


Figure 29 : Rapport du nombre de microphagocytoses/nombre de phagocytoses classiques en fonction de la concentration en glutaraldéhyde utilisée pour le traitement des globules rouges

Les rapports du nombre de microphagocytoses que divise le nombre de phagocytoses classiques ont été calculés à partir des résultats de 4 expériences.

ii) Conclusions

Lors du traitement des globules rouges par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, il y a une diminution du nombre de microphagocytoses et une augmentation des phagocytoses classiques alors que le nombre total de phagocytoses reste constant. Il y a donc un lien entre le mode de phagocytose et le traitement des globules rouges à la glutaraldéhyde: plus la concentration de cette dernière est élevée, plus il y a de phagocytoses classiques. Toutefois, avant de conclure que la glutaraldéhyde modifie le type de phagocytose par augmentation de la rigidité du globule rouge, il faut d'abord vérifier qu'effectivement, dans nos conditions expérimentales de traitement des érythrocytes, la glutaraldéhyde provoque un accroissement mesurable de la rigidité de ces derniers. C'est ce que nous avons cherché à faire dans la suite de notre travail.

3.3. Caractérisation des globules rouges

Quatre techniques ont été utilisées afin de mesurer les caractéristiques physiques des érythrocytes traités à la glutaraldéhyde. Trois de ces techniques, la filtration des globules rouges à travers des membranes de polycarbonate, la détermination du microhématocrite et la mesure du volume apparent des cellules au "Coulter-Counter" sont des techniques de mesure de la déformabilité globale des globules rouges. La quatrième technique, la mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH, fournit plus

particulièrement des résultats sur la fluidité de la fraction lipidique de la membrane.

3.3.1. Mesure de la déformabilité globale des globules rouges

3.3.1.1. Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de filtration à travers des membranes de polycarbonate

Dans cette technique, la déformabilité des érythrocytes est mesurée par la valeur de la pente de la phase d'augmentation linéaire de la pression générée lors de leur passage dans la membrane de filtration. Plus la pente sera forte, moins déformables seront les cellules. Au contraire moins grande sera la pente, plus les érythrocytes seront déformables. La figure 30 représente la valeur des pentes de la phase linéaire d'augmentation de pression des courbes de filtration des globules rouges traités à la glutaraldéhyde tel que défini dans le "matériels et méthodes" à la section 2.7.1.1.. On y voit que pour des concentrations de glutaraldéhyde comprises entre 0,020 et 0,035% la valeur des pentes s'accroît très rapidement traduisant ainsi le fait que le passage de ces globules rouges à travers la membrane de filtration provoque une augmentation de pression de plus en plus grande et de plus en plus rapide. En d'autres termes, ces valeurs de pentes croissantes signifient que les globules rouges perdent de leur déformabilité. Pour des concentrations de glutaraldéhyde inférieures à 0,020% la valeur des pentes est nulle, et au delà de 0,035% elles conservent

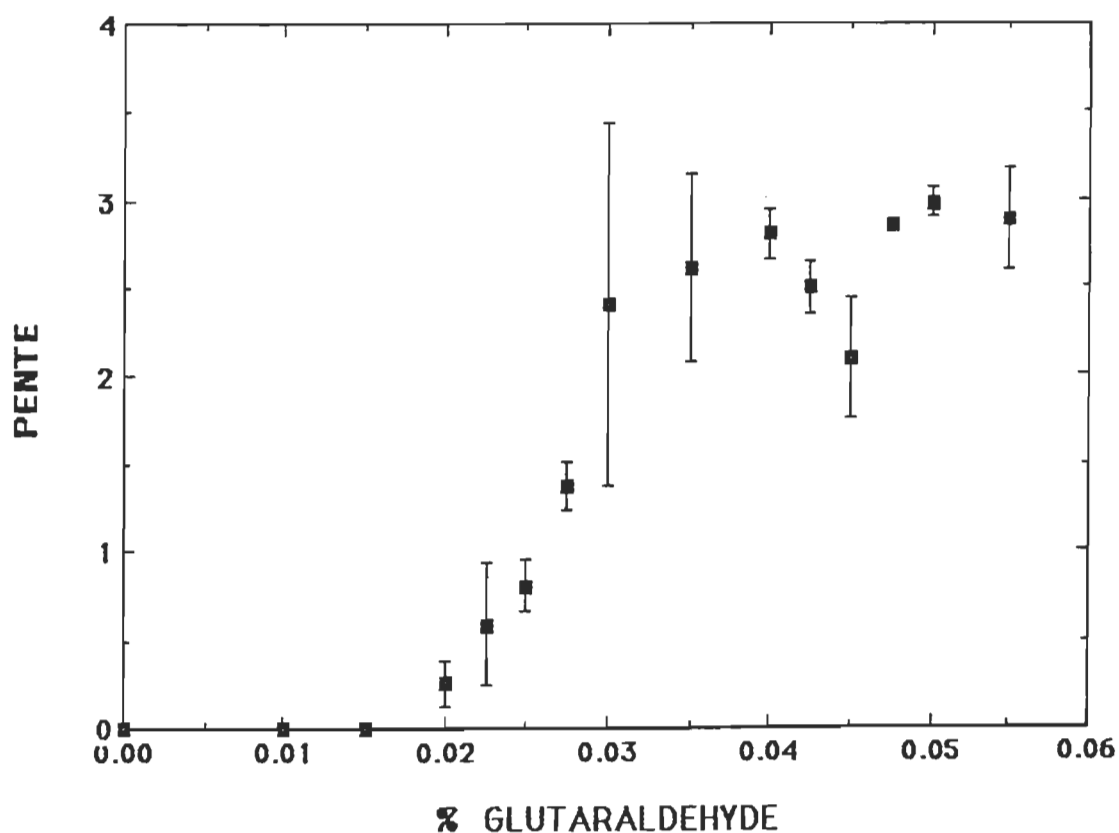


Figure 30 : Déformabilité des globules rouges mesurée par la technique de filtration

La rigidité des globules rouges en fonction de leur traitement à des concentrations croissantes de glutaraldéhyde est caractérisée par la valeur de la pente de la phase linéaire d'augmentation de pression des courbes de filtration. (p est exprimée en unité arbitraire)

des valeurs constantes.

Ces résultats tendent à montrer qu'à partir de 0,02 % de glutaraldéhyde il y a une rigidification ou perte de déformabilité des globules rouges. Cette modification très rapide entre 0,02 % et 0,035 % de glutaraldéhyde semble atteindre une valeur maximale qui n'est pas dépassée pour des traitements des globules rouges à des concentrations supérieures de glutaraldéhyde.

Cependant, nous pouvons émettre au moins deux critiques sur cette technique:

i) Dans nos conditions expérimentales (pores de $8\mu\text{m}$ de diamètre), il n'est pas possible de mesurer de faibles variations de déformabilité des globules rouges, c'est à dire celles concernant les érythrocytes traités à faibles concentrations de glutaraldéhyde (de 0 à 0,015%). Pour y parvenir il aurait fallu utiliser des pores de $3\mu\text{m}$ ou de $5\mu\text{m}$. L'analyse aurait alors été faite par pièces détachées. Or notre but est de comparer la déformabilité des globules rouges sur toute la gamme de concentration de glutaraldéhyde utilisée (de 0 à 0,050%) et ceci ne peut se faire qu'à condition que tous les paramètres expérimentaux restent rigoureusement identiques et en particulier la dimension des pores. Dans le cas qui nous intéresse, les pores de $8\mu\text{m}$ sont les seuls qui nous permettent cette possibilité.

ii) En ce qui concerne les érythrocytes traités aux concentrations de glutaraldéhyde supérieures à 0,035 % , il faut noter que le paramètre mesuré

est la pente de la phase d'augmentation linéaire de pression. Le fait que l'on atteigne à partir de 0,035% en glutaraldéhyde une valeur maximale des pentes peut s'expliquer de la façon suivante: lorsque les globules rouges ont atteint une certaine rigidité, en particulier celle correspondante aux érythrocytes traités à 0,035% de glutaraldéhyde, leur rigidité est telle qu'aucune cellule ne parvient à franchir les pores, entraînant ainsi une augmentation très rapide de la pression. Pour les concentrations supérieures de glutaraldéhyde, le même phénomène se produit, d'où des pentes identiques. Cependant, il est possible que si les pressions nécessaires pour faire passer les érythrocytes à travers les pores étaient mesurables, celles-ci seraient croissantes pour les concentrations croissantes de glutaraldéhyde, indiquant une augmentation de la rigidité des cellules.

En conclusion nous pouvons dire que la mesure de déformabilité des globules rouges par la technique de filtration à travers des membranes, montre que le traitement à la glutaraldéhyde aux concentrations comprises entre 0,020% et 0,035%) entraîne une perte de la déformabilité ou une rigidification des globules rouges.

Cependant la technique ne permet pas de préciser si la déformabilité des globules rouges est modifiée pour des concentrations de glutaraldéhyde inférieures à 0,02% et supérieures à 0,035%. Afin de mesurer l'effet de la glutaraldéhyde pour de telles concentrations, d'autres techniques de mesure de la déformabilité des globules rouges ont été utilisées.

3.3.1.2. Mesure de la déformabilité des globules rouges par la technique de détermination du microhématocrite et le "Coulter-Counter"

Bien que basées sur des principes physiques différents, les techniques du microhématocrite et du "Coulter-Counter" permettent de mesurer les mêmes paramètres, soit le nombre de globules rouges présents par unité d'hématocrite, le coefficient d'accroissement apparent du volume des globules rouges et leur volume apparent qui représentent en fait la déformabilité globale des érythrocytes. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont donc représentés sur les mêmes figures (figures 31, 32, 33).

i) Détermination du nombre de globules rouges présents par unité d'hématocrite

La figure 31 représente le nombre de globules rouges présents dans un hématocrite de 1% en fonction de leur traitement par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, soit le nombre N_i défini dans la section "matériels et méthodes" (section 2.7.1.2). On y voit, par la technique du microhématocrite, qu'après une et trois minutes de centrifugation, l'on assiste, à une diminution du nombre d'érythrocytes présents par unité d'hématocrite en fonction de la concentration croissante de glutaraldéhyde utilisée lors du traitement des globules rouges. Le même phénomène est observé par la technique du "Coulter-Counter" mais de façon moins marquée.

Figure 31: Mesure de la déformabilité des érythrocytes: détermination du nombre (Ni) de globules rouges présents par unité d'hématocrite

La déformabilité des globules rouges traités par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde est caractérisée par le nombre (Ni) de globules rouges (GR) présents dans un hématocrite (HCT) de 1%.

—△— Nombre (Ni) de globules rouges (GR) présents dans un hématocrite de 1% déterminé au "Coulter-Counter".

—■— Nombre (Ni) de globules rouges (GR) présents dans un hématocrite de 1% déterminé par la technique du microhématocrite après 1 minute de centrifugation.

—□— Nombre (Ni) de globules rouges (GR) présents dans un hématocrite de 1% déterminé par la technique du microhématocrite après 3 minutes de centrifugation.

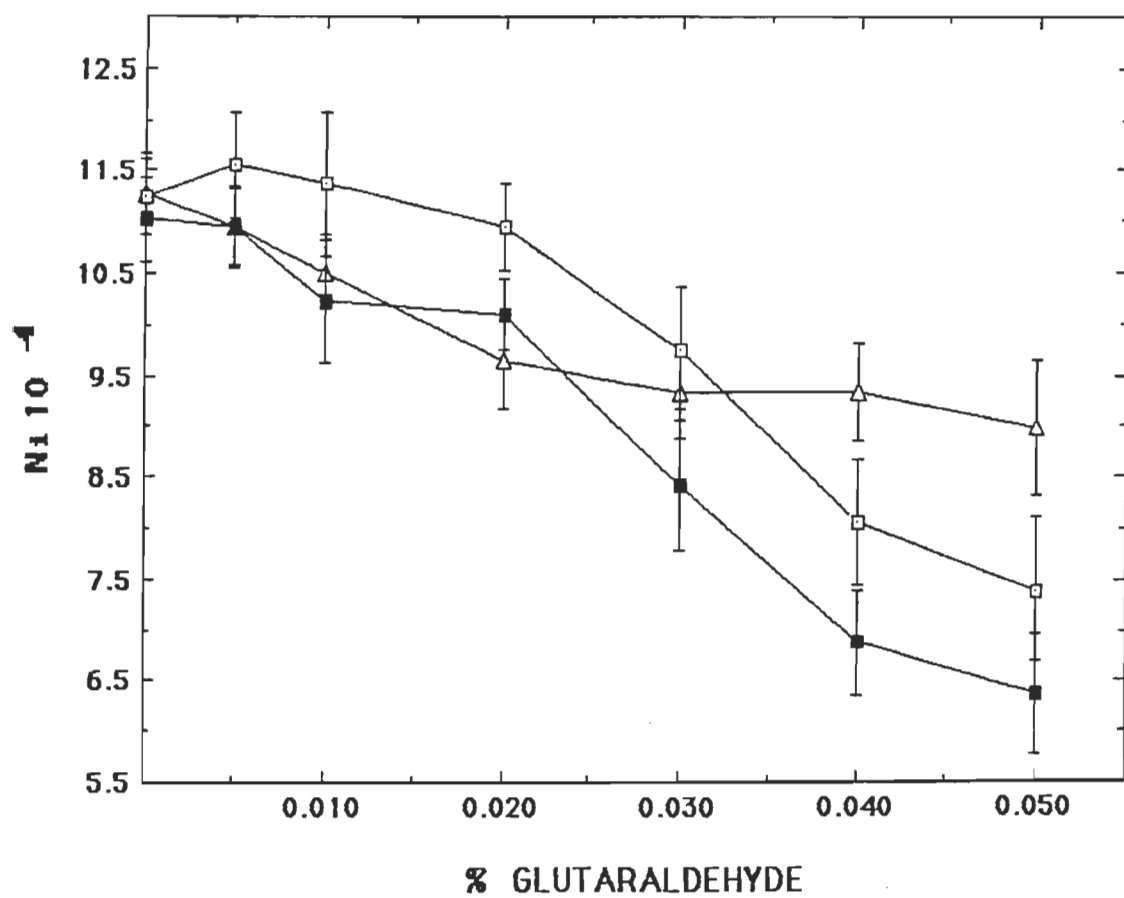


Figure 32 : Mesure de la déformabilité des érythrocytes: détermination du coefficient (Cx) d'accroissement apparent du volume des globules rouges

La déformabilité des globules rouges traités par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde est caractérisée par le coefficient (Cx) d'accroissement apparent de leur volume.

—△— Coefficient (Cx) d'accroissement apparent du volume des globules rouges déterminé au "Coulter-Counter".

—■— Coefficient (Cx) d'accroissement apparent du volume des globules rouges déterminé par la technique du microhématocrite après 1 minute de centrifugation.

—□— Coefficient (Cx) d'accroissement apparent du volume des globules rouges déterminé par la technique du microhématocrite après 3 minutes de centrifugation.

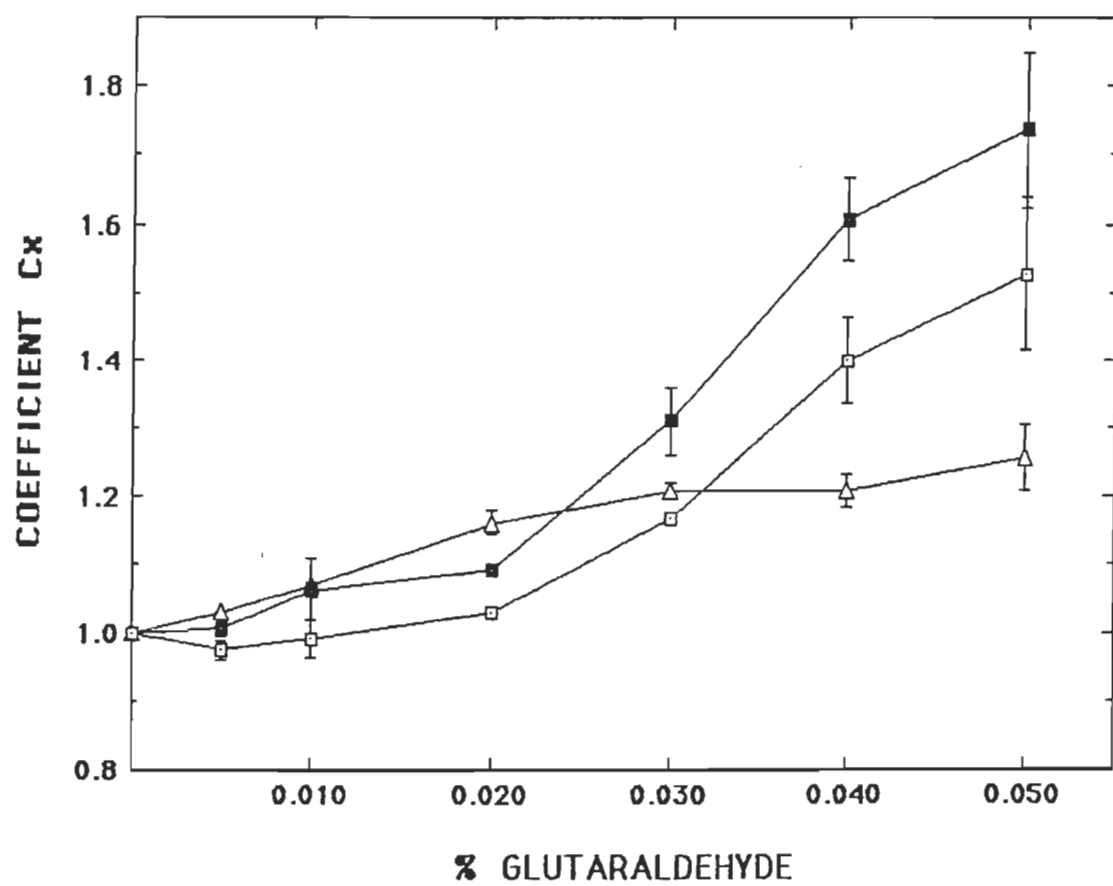


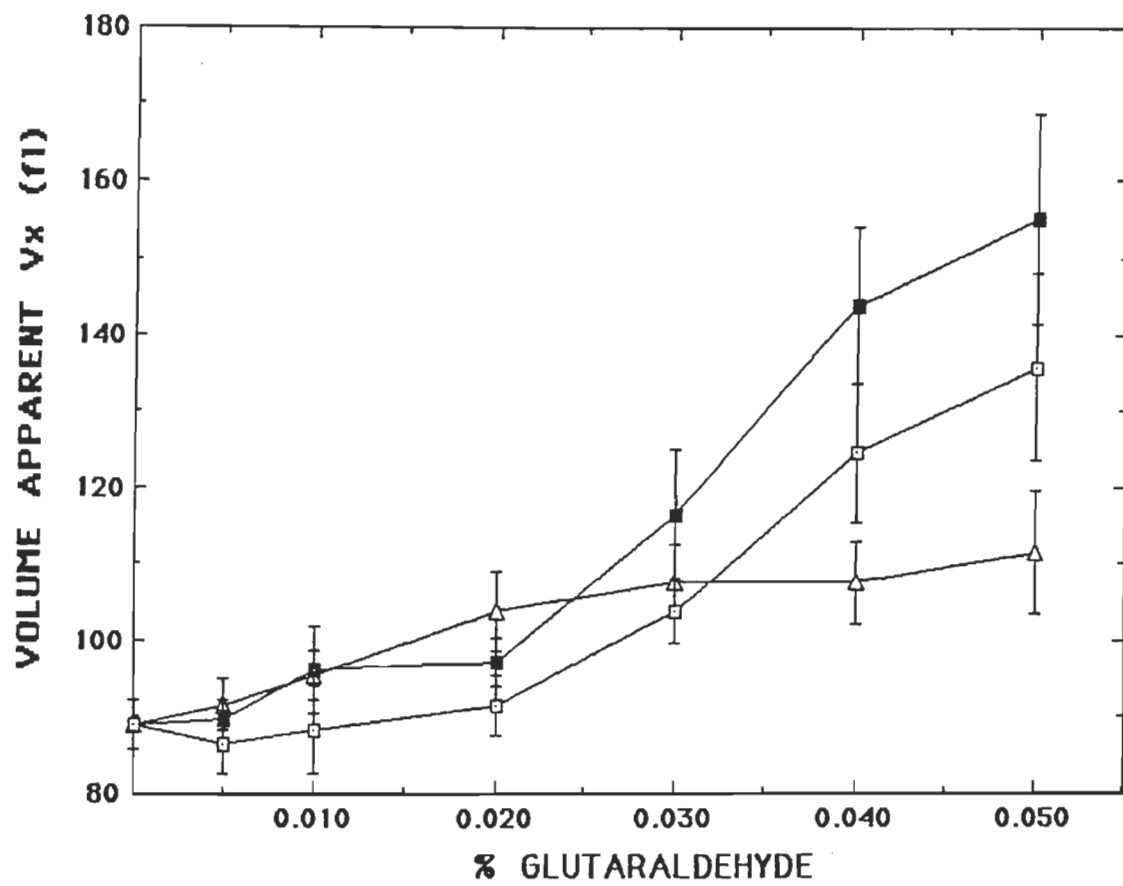
Figure 33 : Mesure de la déformabilité des érythrocytes : détermination du volume apparent des globules rouges

La déformabilité des globules rouges traités par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde est caractérisée par leur volume apparent.

—△— Volume apparent des globules rouges exprimé en fl, déterminé au "Coulter-Counter".

—■— Volume apparent des globules rouges exprimé en fl, déterminé par la technique du microhématocrite après 1 minute de centrifugation.

—□— Volume apparent des globules rouges exprimé en fl, déterminé par la technique du microhématocrite après 3 minutes de centrifugation.



Dans le cas de la technique du microhématocrite, la perte de déformabilité des globules rouges les empêche, lors de la centrifugation, de s'imbriquer les uns dans les autres. Il en résulte que le culot globulaire de ces érythrocytes rigidifiés occupe un volume plus grand dans le capillaire que celui des globules rouges normaux. Par conséquent, l'hématocrite qui représente le rapport du volume occupé par le culot globulaire sur le volume total du capillaire est, dans le cas de ces cellules rigidifiées, plus élevé que dans le cas des cellules normales. Or, le nombre de cellules présentes par unité de volume dans la suspension avant centrifugation étant le même dans les deux cas (cellules rigidifiées et normales), l'augmentation du volume du culot globulaire, et donc de l'hématocrite des érythrocytes rigidifiés, se traduit par une diminution de leur nombre réel par unité d'hématocrite.

Dans le cas du "Coulter-Counter", la diminution du nombre réel de globules rouges par unité d'hématocrite résulte aussi de la rigidification des cellules. En effet tel qu'il a été expliqué dans la section "matériel et méthodes", lorsque les globules rouges sont rigidifiés, la force hydrodynamique qu'ils subissent devient insuffisante pour les déformer de la même façon que les globules rouges non rigidifiés. Ceci a comme conséquence que leur volume apparent mesuré au "Coulter-Counter", est plus grand que celui des érythrocytes normaux. L'hématocrite est donc plus élevé et, finalement, leur nombre par unité d'hématocrite plus petit.

ii) Détermination du coefficient d'augmentation du volume apparent C_x des globules rouges

Le coefficient d'augmentation du volume apparent des globules rouges (défini à la section 2.7.1.2. du chapitre "matériel et méthodes"), en fonction de leurs traitements à la glutaraldéhyde est représenté sur la figure 32. Quel que soit la technique utilisée, ce coefficient C_x augmente lorsque l'on traite les globules rouges avec des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, ce qui traduit la perte de déformabilité des globules rouges.

En effet tel que nous l'avons expliqué dans la section précédente, la perte de déformabilité des cellules, mesurée par la technique du microhématocrite, conduit après centrifugation à une augmentation du volume du culot globulaire, et donc à une diminution du nombre N_i de cellules présentes par unité d'hématocrite. Le rapport des nombres N_i des globules rouges rigidifiés et normaux va fournir le coefficient d'augmentation du volume apparent des érythrocytes rigidifiés. Plus N_i sera petit, plus les globules rouges auront été rigidifiés. Dans le cas du "Coulter-Counter", le rapport des volumes apparents des cellules est calculé à partir des volumes apparents fournis directement par l'appareil.

iii) Détermination du volume apparent des globules rouges

Le volume apparent des globules rouges obtenu de façon directe au

"Coulter-Counter", et indirectement par la technique du microhématocrite (voir matériels et méthodes section 2.7.1.2.), en fonction des concentrations croissantes de glutaraldéhyde utilisées lors de leurs traitements apparaît à la figure 33. Le volume apparent des érythrocytes qui dans le cas de la technique du microhématocrite est obtenu en multipliant le volume des globules rouges normaux par le coefficient d'augmentation apparent C_x des globules rouges traités à la glutaraldéhyde, croît en fonction de la concentration de glutaraldéhyde. Cette augmentation du volume apparent des érythrocytes traduit la perte de déformabilité des cellules traitées.

iv) Critique des mesures de déformabilité des globules rouges par la technique du microhématocrite et du "Coulter-Counter"

Ces résultats montrent que quelle que soit la technique utilisée (détermination du microhématocrite et le "Coulter-Counter"), le traitement des globules rouges par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde provoque une diminution progressive du nombre réel de cellules par unité d'hématocrite (figure 31), une augmentation du coefficient C_x qui représente l'augmentation apparente du volume des cellules (figure 32) et du volume apparent des érythrocytes (figure 33).

Il en ressort nettement que le traitement des érythrocytes à la glutaraldéhyde affecte chacun de ces paramètres qui ne sont en fait que deux façons différentes d'exprimer le même phénomène, c'est à dire une

rigidification progressive des érythrocytes par le traitement à la glutaraldéhyde.

Le "Coulter-Counter" semble détecter de plus faibles variations de déformabilité des globules rouges que la technique du microhématocrite puisque pour de faibles concentrations de glutaraldéhyde allant jusqu'à 0,020%, chacun des paramètres mesurés varie de façon linéaire, alors que par l'autre technique et, en particulier, après trois minutes de centrifugation il faut atteindre des concentrations de glutaraldéhyde au moins égales à 0,020% pour que les valeurs deviennent significatives. Au delà de cette concentration, le "Coulter-Counter" perd de sa sensibilité de détection de variations de déformabilité des globules rouges alors que la technique du microhématocrite en gagne.

Cette différence de sensibilité des deux techniques peut s'expliquer de la façon suivante: dans le cas du microhématocrite, la force centrifuge à laquelle les globules rouges sont soumis est suffisamment élevée pour pouvoir déformer de la même manière les érythrocytes traités jusqu'à 0,020% de glutaraldéhyde. Au delà de cette concentration, les érythrocytes sont suffisamment rigidifiés pour que la force centrifuge les déforme de moins en moins avec les concentrations croissantes de glutaraldéhyde, d'où des hématocrites croissants. Dans le cas du "Coulter-Counter" le phénomène inverse se produit, c'est à dire que jusqu'à 0,020% de glutaraldéhyde, la force hydrodynamique à laquelle les globules rouges sont soumis est telle qu'elle les déforme de moins en moins, d'où les volumes apparents des érythrocytes

deviennent de plus en plus grands. Au delà de 0,020% de glutaraldéhyde la force hydrodynamique n'est plus capable de déformer les cellules ce qui se traduit par des valeurs constantes du volume apparent des érythrocytes.

On peut se poser la question de savoir si l'augmentation du volume des globules rouges suite aux traitements à la glutaraldéhyde et mesuré par les techniques du microhématocrite et du "Coulter-Counter" est uniquement une augmentation apparente du volume des cellules ou si à cela ne s'ajoute pas une augmentation réelle du volume.

Corry *et al.* (1978) ont fait des mesures de déformabilité des globules rouges traités à des concentrations millimolaires de glutaraldéhyde par les techniques du microhématocrite et du "Coulter-Counter". Ils observent un accroissement du volume apparent des globules rouges qu'ils attribuent exclusivement à la perte de déformabilité des cellules suite à ce traitement.

Dans des articles critiquant les travaux de Corry *et al.* (1978), Yee *et al.* (1978) et Mel *et al.* (1978) attribuent l'accroissement du volume des érythrocytes traités à la glutaraldéhyde et mesuré au "Coulter-Counter" à deux facteurs: le premier est dû à une baisse de la déformabilité des globules rouges et le deuxième à un accroissement réel du volume des cellules consécutif au traitement à la glutaraldéhyde. Cependant, l'accroissement réel des érythrocytes ne se produirait que pour des concentrations de glutaraldéhyde supérieures à 0,050 %. Or la gamme de concentrations de glutaraldéhyde utilisées dans nos expériences de phagocytose est comprise

entre 0 et 0.055 % . On peut donc admettre qu'à ces faibles concentrations que nous avons utilisées, l'accroissement de volume apparent des globules rouges mesuré au "Coulter-Counter" dépend uniquement de la rigidification des cellules.

3.3.1.3. Conclusion des mesures de déformabilité globale des globules rouges

La technique de mesure de la déformabilité globale des globules rouges par filtration sur des membranes de polycarbonate indique qu'il y a une perte de la déformabilité des cellules mais ceci uniquement à partir de concentrations en glutaraldéhyde supérieures à 0,020 %. Elle ne permet pas de voir si cette déformabilité continue à diminuer lors du traitement à des concentrations supérieures à 0,035 %.

Les mesures de déformabilité globale des globules rouges par les techniques du microhémotocrite et du "Coulter-Counter", montrent que le traitement des globules rouges à des concentrations croissantes de glutaraldéhyde (de 0 à 0,055 %) provoque une rigidification progressive des érythrocytes et ce pour toutes les concentrations testées.

Parallèlement à la perte de déformabilité des globules rouges provoquée par le traitement à la glutaraldéhyde, nous avons montré que lors de l'ingestion de ces érythrocytes par l'amibe il y a une diminution des microphagocytoses et augmentation des phagocytoses classiques. Il semble

donc qu'il existe une corrélation entre le mode de phagocytose et la déformabilité des globules rouges.

3.3.2. Mesure de la fluidité de la fraction lipidique de la membrane des globules rouges par mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH

Les mesures de déformabilité globale des globules rouges ont montré que lors du traitement par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde (0 à 0,055%) il y a une diminution de la déformabilité des cellules ainsi traitées, et que plus les globules rouges sont rigides, plus ils sont absorbés par phagocytose classique.

Afin de voir si ces mêmes traitements à la glutaraldéhyde ont un effet sur la fluidité de la fraction lipidique de la membrane de l'érythrocyte, nous avons effectué des mesures d'anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans la membrane des globules rouges rigidifiés.

i) Résultats

Lorsqu'on mesure la variation de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans la gamme de concentrations de glutaraldéhyde comprise entre 0 et 0,050% qui est celle où ont été faites les expériences de phagocytose, les valeurs de l'anisotropie de fluorescence (r_s) ne varient pas de façon

significative (figure 34 **A**). Ceci semble donc indiquer que le traitement des globules rouges à ces concentrations de glutaraldéhyde ne modifie pas la fluidité de la fraction lipidique de la membrane.

Pour s'assurer que la technique de mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH est une technique valable, nous avons refait ces mesures mais avec des concentrations de glutaraldéhyde beaucoup plus élevées. Lors du traitement des globules rouges à des concentrations de glutaraldéhyde comprises entre 0 et 1% l'anisotropie de fluorescence du DPH augmente de façon linéaire (Fig. 34 **B**). Ceci montre que le pontage des protéines par la glutaraldéhyde entraîne une diminution de la mobilité de la sonde de fluorescence dans la fraction lipidique de la membrane, traduisant ainsi une perte de la fluidité.

Il faut cependant noter que les concentrations de glutaraldéhyde, qui varient de 0 à 1 % dans cette expérience, sont beaucoup plus grandes que celles utilisées lors des expériences de phagocytose qui, elles, étaient situées, on s'en souviendra, entre 0 et 0,055 % de glutaraldéhyde.

ii) Discussion des mesures d'anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans la membrane des globules rouges traités à la glutaraldéhyde

L'absence de variation significative de l'anisotropie de fluorescence du DPH pour des concentrations de glutaraldéhyde variant entre 0 et 0,055% indique que ce traitement n'affecte pas la fluidité de la fraction lipidique de la

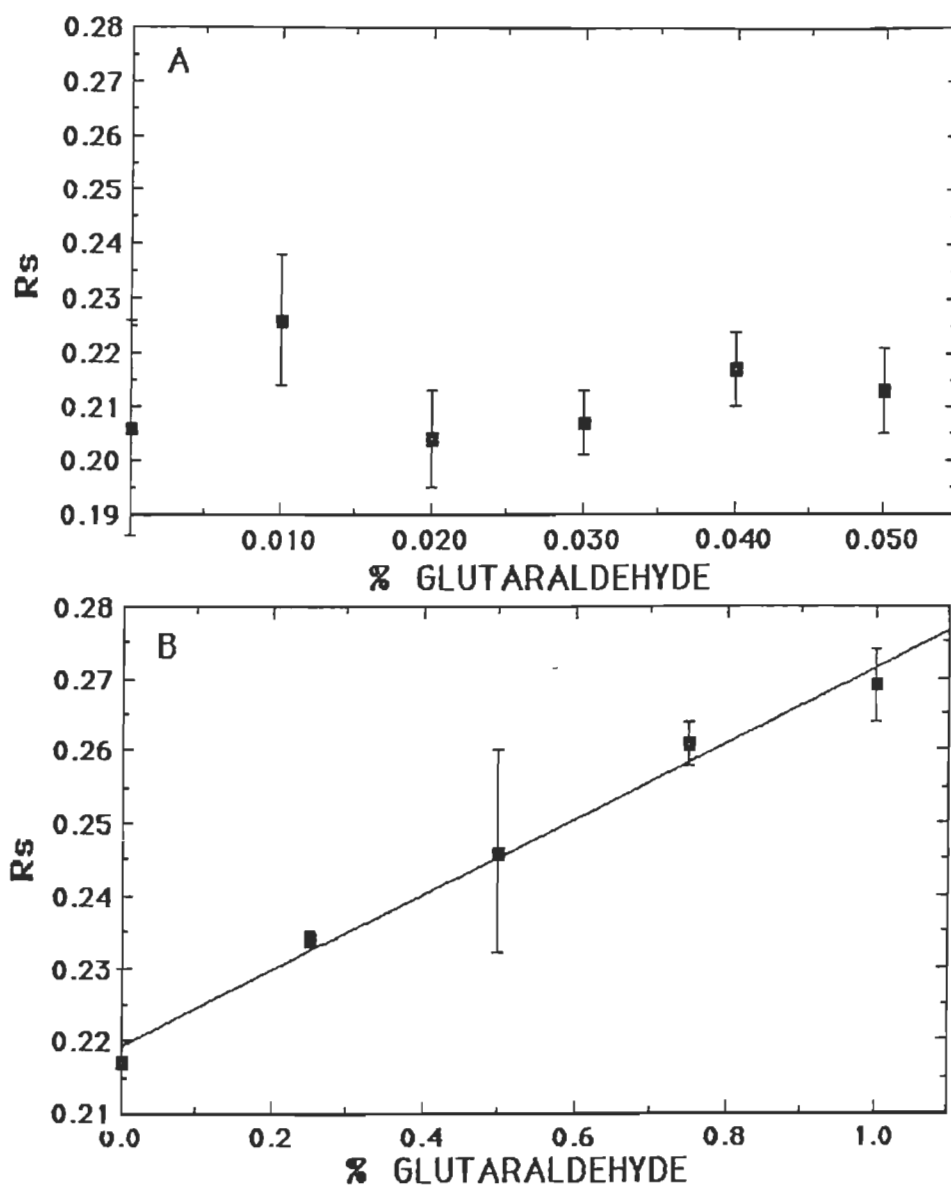


Figure 34 : Mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans la membrane des globules rouges traités à la glutaraldéhyde

A. Concentration de glutaraldéhyde variant de 0 à 0.050 %

B. Concentration de glutaraldéhyde variant de 0 à 1 %

membrane des globules rouges ainsi traités.

Araiso *et al.* (1986) proposent que le pontage des protéines intégrales et du réseau de spectrine par des traitements à des concentrations de glutaraldéhyde comprises entre 0 et 1% réduit très fortement la flexibilité des protéines. Dans une membrane ainsi rigidifiée, les protéines formeraient un cadre rigide pour la couche lipidique ce qui restreindrait la mobilité du DPH. Lors du traitement des érythrocytes à des concentrations de glutaraldéhyde variant de 0 à 0,050% l'anisotropie de fluorescence du DPH n'étant pas modifiée de façon significative, on peut supposer que le pontage n'est pas suffisant pour former un tel cadre rigide susceptible de modifier la fluidité de la fraction lipidique de la membrane. Cependant, cela n'exclut pas, ainsi que nous l'avons vu à la section 3.3.1., qu'une autre propriété physique de l'érythrocyte, en particulier sa déformabilité globale, puisse être affectée par le traitement à la glutaraldéhyde.

3.3.3. Conclusion sur la caractérisation des globules rouges traités à la glutaraldéhyde

Le comptage des différents types de phagocytose a montré que l'augmentation des concentrations de glutaraldéhyde utilisées lors du traitement des globules rouges est accompagnée d'une rigidification croissante de ces cellules. D'autre part, plus les cellules sont rigidifiées plus elles sont ingérées par phagocytose classique.

A ces mêmes concentrations de glutaraldéhyde, les mesures d'anisotropie de fluorescence du DPH indiquent que la fluidité de la fraction lipidique de la membrane des érythrocytes n'est pas affectée.

Cet ensemble de résultats, phagocytose de globules rouges traités à des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, mesure de la déformabilité globale des érythrocytes, semble indiquer qu'il existe une corrélation entre le mode de phagocytose observé et la déformabilité de l'érythrocyte.

On peut cependant émettre une objection à cette conclusion. En effet, il se pourrait que la glutaraldéhyde modifie des récepteurs membranaires présents à la surface des globules rouges et que cette modification soit responsable du mode de phagocytose observé. Pour tester cette hypothèse, deux expériences ont été réalisées. Ce sont, d'une, part la phagocytose de mélanges de globules rouges traités à différentes concentration de glutaraldéhyde, et d'autre part la phagocytose de "ghosts" ou "fantômes" d'érythrocytes traités à la glutaraldéhyde.

3.4. La déformabilité du globule rouge est le facteur déterminant le mode de phagocytose

3.4.1. Phagocytose de mélanges de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde

Si le traitement des érythrocytes à la glutaraldéhyde provoque une modification d'un récepteur membranaire présent à leur surface, et responsable du mode de phagocytose par *Entamoeba histolytica*, lorsqu'on donne à l'amibe un mélange de globules rouges non traités ou faiblement traités et de globules rouges fortement traités à la glutaraldéhyde on peut s'attendre à observer la sélection d'un type de globule rouge ou d'un mode de phagocytose par l'amibe.

i) Résultats

Pour réaliser cette expérience, deux mélanges contenant des globules rouges ayant été traités à des concentrations différentes de glutaraldéhyde sont donnés à *Entamoeba histolytica*. Le premier mélange est constitué de quantités égales de globules rouges non traités et de globules rouges traités par 0,050 % de glutaraldéhyde. On appellera ce mélange, le mélange (0+0,05).

Le deuxième mélange contient des globules rouges faiblement traités (0,010 %) et des globules rouges fortement traités (0,050 %) à la

glutaraldéhyde. Ce mélange s'appellera, mélange (0,01+0,05)

La figure 35 montre les résultats des comptages des différents types de phagocytoses observées lors de l'ingestion de ces mélanges ainsi que ceux des expériences contrôles où une seule espèce d'érythrocyte est donnée à l'amibe. Sur le graphique, figure en abscisse le type de globules rouges donné à l'amibe. Les érythrocytes sont caractérisés par la concentration de glutaraldéhyde utilisée lors de leur traitement. En ordonnée, apparaît le nombre de phagocytoses de types différents observés sur 100 amibes prises au hasard.

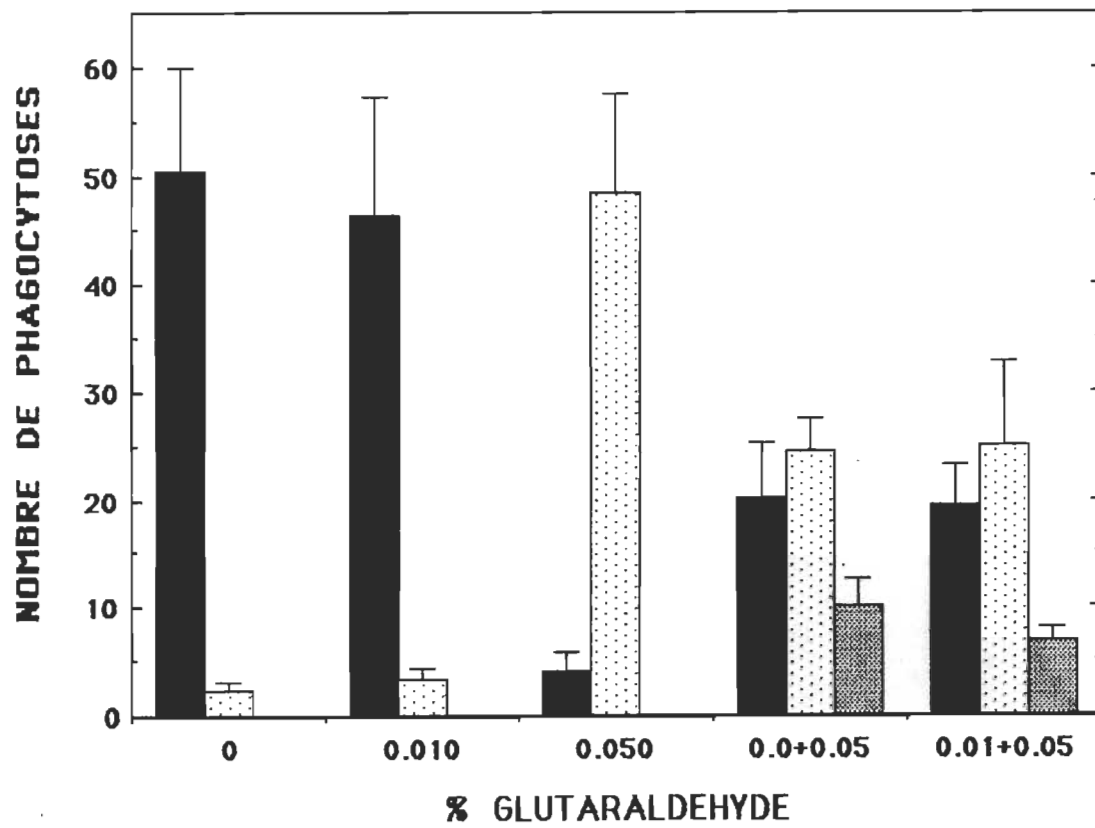
La figure montre qu'en ce qui concerne les contrôles, les résultats sont semblables à ceux obtenus précédemment (section 3.2.), c'est à dire, dans le cas des érythrocytes non traités ou faiblement traités (0,010%) une prédominance des microphagocytoses, et dans le cas des cellules fortement traitées (0,050 %) une prédominance des phagocytoses classiques. Lorsque les amibes sont mises en présence des mélanges 1:1 d'érythrocytes [(0+0,05) ou (0,01+0,05)] (figure 35), deux faits intéressants apparaissent: premièrement les deux types de phagocytose sont présents en quantités égales, ce qui indique qu'il n'y a donc pas de sélection par l'amibe d'un type de globule rouge, ou d'un mode de phagocytose. Deuxièmement, il faut noter l'apparition, dans le cas des mélanges, d'une proportion non négligeable d'amibes sur lesquelles les deux types de phagocytose sont présents.

Figure 35 : Phagocytose de mélanges 1:1 de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde

Dans les expériences contrôles une seule espèce de globules rouges (0), (0,010) ou (0,050) % est donnée à l'amibe. Les mélanges (0+0,050) et (0,010+0,050) % sont constitués de globules rouges non traités (0%) ou faiblement traités à la glutaraldéhyde (0,010%) avec des globules rouges fortement traités (0,050%). A noter que dans le cas des mélanges, une proportion non négligeable d'amibes phagocytent simultanément par les deux modes d'ingestion.

- Nombre de microphagocytoses observées sur 100 amibes
- Nombre de phagocytoses classiques observées sur 100 amibes
- ▣ Nombre d'amibes présentant simultanément les deux modes de phagocytose.

Les moyennes sont obtenues à partir de 4 expériences faites 3 fois.



ii) Discussion sur les résultats de la phagocytose de mélanges de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde

Si, suite au traitement à la glutaraldéhyde il y avait eu une modification d'un récepteur membranaire du globule rouge responsable du mode de phagocytose par l'amibe, lors de l'ingestion de mélanges 1:1 d'érythrocytes traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde, le rapport des deux types de phagocytose (microphagocytose et phagocytose classique) aurait pu être différent de 1. Or, ce rapport étant égal à 1 tout se passe comme s'il n'y avait pas de sélection d'un mode de phagocytose, ou d'un type de globule rouge, mais que seule la déformabilité de la cellule cible était le facteur déterminant du mode d'ingestion.

En 1985 Bailey *et al.*, ont donné à *Entamoeba histolytica* d'une part des globules rouges, d'autre part des billes de latex de même dimension que les érythrocytes, et finalement un mélange des deux. Lorsque les billes seules sont données à l'amibe, leur taux de phagocytose bien qu' élevé est cependant légèrement inférieur à celui des érythrocytes seuls. Cependant, lorsque les billes de latex sont en mélange avec les globules rouges, alors que le taux de phagocytose des globules rouges reste inchangé, celui des billes est très fortement diminué. Il y a donc une sélection préférentielle des érythrocytes par l'amibe.

Dans nos expériences, lors de la phagocytose du mélange d'érythrocytes (0+0,05), s'il y avait eu une modification d'un récepteur membranaire de

l'érythrocyte par la glutaraldéhyde, les résultats auraient pu être similaires à ceux de Bailey *et al.* (1985) en ce sens que les microphagocytoses auraient été le mécanisme prédominant, indiquant par là une sélection des globules rouges non traités par l'amibe. En ce qui concerne le mélange de globules rouges (0,01+0,05) le phénomène est plus complexe. En effet si le traitement à la glutaraldéhyde modifie des récepteurs membranaires des érythrocytes, le traitement par 0,010% de glutaraldéhyde pourrait être suffisant pour induire la modification. Dans ce cas, les deux populations de globules rouges (0,01) et (0,05) ayant été traitées, les microphagocytoses et les phagocytoses classiques devraient être présentes en quantités égales. Une autre possibilité serait que 0,010% de glutaraldéhyde, soit insuffisant pour induire la modification des récepteurs des érythrocytes ainsi traités. Dans ce cas, on pourrait avoir une majorité de microphagocytoses, traduisant la sélection des érythrocytes faiblement traités. Or il n'en est rien. Pour les deux mélanges, (0+0,05) et (0,01+0,05), les deux modes d'ingestion sont présents en quantités équivalentes ce qui semble indiquer que le traitement à la glutaraldéhyde n'entraîne pas de modification d'un récepteur membranaire susceptible de déterminer le mode de phagocytose par l'amibe.

La présence d'une proportion non négligeable d'amibes procédant simultanément à l'ingestion des érythrocytes par les deux modes de phagocytose, vient renforcer l'idée que le mécanisme de phagocytose ne dépend pas des amibes (présence de différentes sous populations d'amibes ayant des pouvoirs de phagocytose différents), mais bien des propriétés mécaniques de la cellule cible.

Cette proportion d'amibes qui utilisent les deux modes de phagocytose peut sembler anormalement faible si on admet que l'ingestion des globules rouges se fait au hasard, et qu'il n'y a pas de sélection par l'amibe d'un type de globule rouge ou d'un mode de phagocytose. En effet, en absence de toute sélection, la plupart des amibes devraient utiliser les deux types de phagocytose en même temps, et donc la proportion de celles qui n'utilisent qu'un mode de phagocytose devrait être faible. Or c'est le phénomène inverse qui se produit: une majorité d'amibes ingèrent par un seul mécanisme, soit par microphagocytose, soit par phagocytose classique, et une minorité présente en même temps les deux modes d'ingestion. Cette anomalie peut s'expliquer en tenant compte du fait que les comptages des phagocytoses sont faits après 20 minutes de mise en contact des amibes et des érythrocytes, or après ce laps de temps, très peu d'amibes ont phagocyté plus d'un globule rouge. Il en résulte que le nombre d'amibes ayant utilisé un seul mode d'ingestion est artificiellement élevé.

iii) Conclusion sur les résultats de la phagocytose de mélanges de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde

Etant donné que, lorsque les amibes sont mises en présence des mélanges 1:1 d'érythrocytes [(0+0,05) ou (0,01+0,05)] (figure 35), les deux types de phagocytose sont présents en quantités égales, et que l'on note l'apparition d'une proportion non négligeable d'amibes sur lesquelles les deux types de phagocytose sont présents, on peut conclure que l'amibe phagocyte chacun

des deux types de globules rouges sans préférence et ce, par un mécanisme qui est le même que celui qu'elle utilise lorsque un seul type d'érythrocyte lui est présenté.

3.4.2. Phagocytose de "ghosts" et d'érythrocytes traités à la glutaraldéhyde

La deuxième expérience destinée à vérifier l'hypothèse suivant laquelle le traitement à la glutaraldéhyde des globules rouges modifierait des récepteurs membranaires présents à leurs surfaces, et qui seraient responsables du mode de phagocytose par l'amibe, consiste à remplacer les érythrocytes traités à la glutaraldéhyde par des "ghosts" ou "fantômes" ayant subi le même traitement.

Les "ghosts" sont des érythrocytes qui ont perdu une grande proportion de leur contenu en hémoglobine. Lorsqu'ils sont traités à la glutaraldéhyde ils sont moins rigides que les globules rouges correspondants puisqu'il n'y a pas ou peu de pontage de l'hémoglobine. Ainsi, lors de la phagocytose par l'amibe de ces "ghosts" traités à la glutaraldéhyde, s'ils sont ingérés de la même façon que les érythrocytes, on pourra admettre que c'est la modification de récepteurs membranaires induite par le traitement à la glutaraldéhyde qui détermine le mode de phagocytose. Dans le cas contraire, si même après des traitements à de fortes concentrations de glutaraldéhyde, les "ghosts" sont encore ingérés par microphagocytose, on aura de bonnes indications que le facteur déterminant du mode de phagocytose des globules

rouges par l'amibe est la déformabilité.

i) Resultats

La figure 36 montre le résultat de l'ingestion par l'amibe de globules rouges traités à la glutaraldéhyde 0,055%. A cette concentration, les érythrocytes étant fortement rigidifiés, ils sont ingérés par phagocytose classique et leur forme biconcave caractéristique est conservée.

Lors de l'ingestion par l'amibe de "ghosts" (figure 37), quelle que soit la concentration de glutaraldéhyde utilisée pour les traiter et ce, jusqu'à 0,12%, soit plus de deux fois la concentration maximale utilisée pour le traitement des érythrocytes, le seul mode de phagocytose est la microphagocytose.

ii) Discussion de la phagocytose de "ghosts" traités à la glutaraldéhyde

Comme les "ghosts" ont perdu leur hémoglobine, il n'est pas possible de les colorer à la benzidine. Afin de les visualiser au microscope optique, ils sont chargés de carboxyfluorescéine puis traités à la glutaraldéhyde.

Au cours des expériences de phagocytose de globules rouges, les amibes et les érythrocytes sont fixés à la glutaraldéhyde afin de faire des comptages après des temps d'incubation déterminés. Dans le cas des "ghosts" chargés

Figure 36 : Phagocytose d'érythrocytes traités à la glutaraldéhyde 0,050%

On distingue clairement à l'intérieur de deux amibes 4 et 5 globules rouges dont la forme biconcave est bien conservée.

(Contraste de phase)

Barre = 10 μ m

Figure 27 : Deux modes de phagocytose différents présents sur la même amibe

Trois érythrocytes (A, B, C) sont en contact direct avec l'amibe. Le globule rouge (A) est ingéré par phagocytose classique. Une coupe dans un canal de microphagocytose (flèche) où l'on voit une membrane de globule rouge fortement repliée indique que l'amibe l'a ingéré par microphagocytose. On note également la présence de vacuoles digestives contenant divers débris dans le cytoplasme de l'amibe. N=noyau.

Barre = 1 μ m

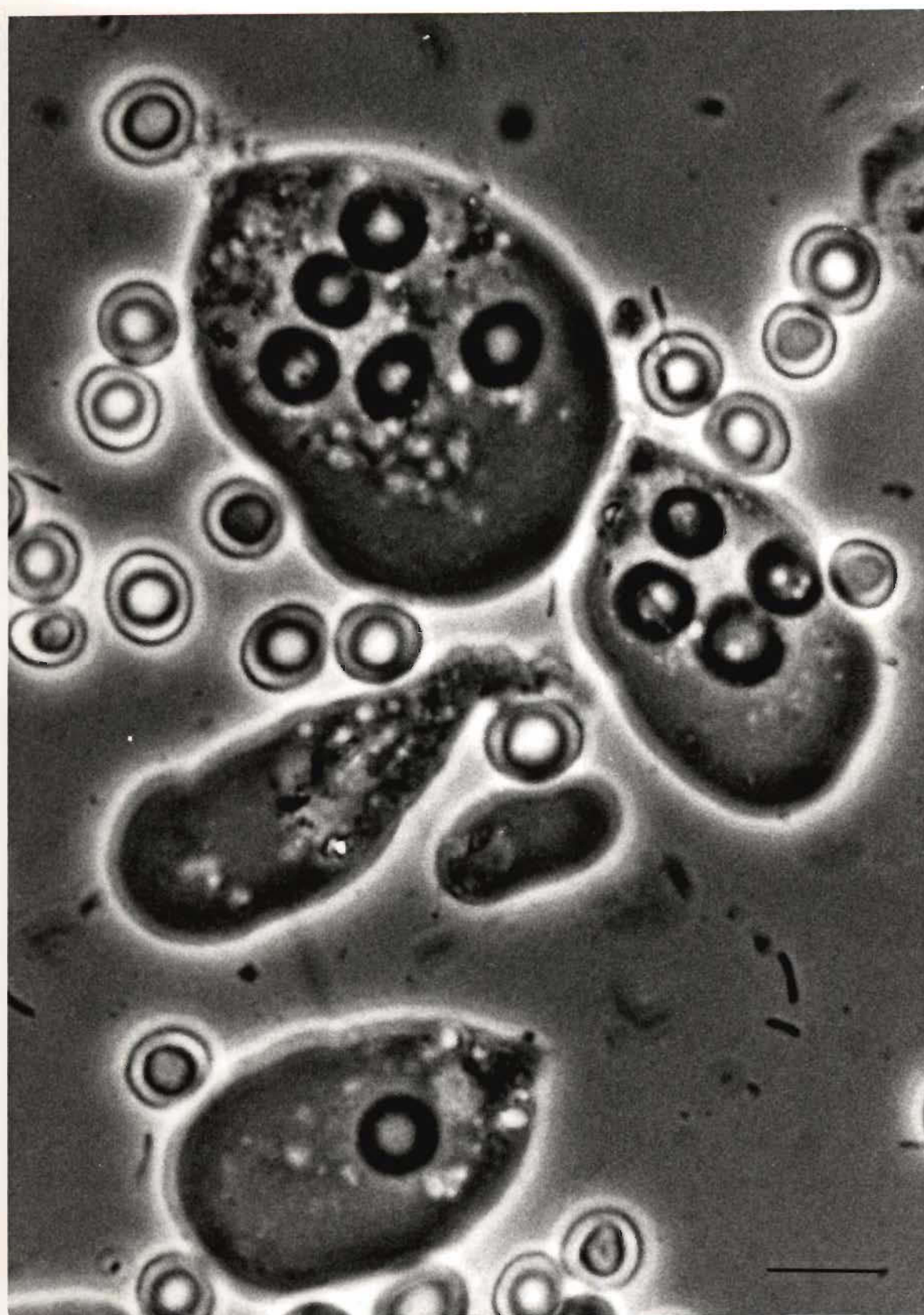
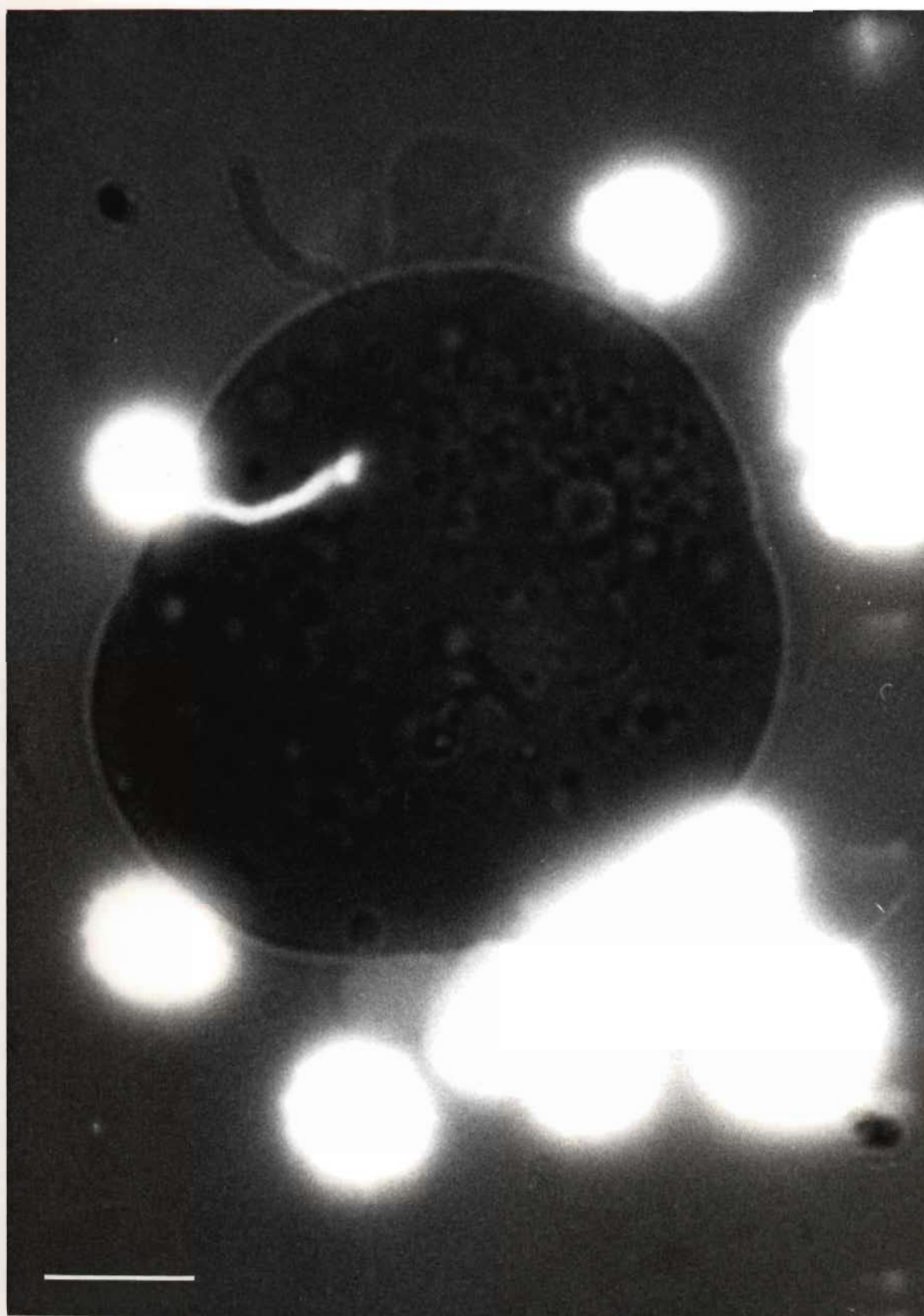


Figure 37: Phagocytose d'un "ghost" chargé de carboxyfluorescéine et traité à la glutaraldéhyde

Le "ghost" fluorescent est ingéré par microphagocytose.
L'observation est faite en contraste de phase et fluorescence.
Barre = 10 μ m



de carboxyfluorescéine ($\lambda_{em}=520$ nm), la fixation à la glutaraldéhyde est exclue. En effet, bien que la glutaraldéhyde en solution ne soit pas fluorescente, lors de la fixation des tissus, le nouveau composé issu du pontage des protéines par la glutaraldéhyde fluoresce ($\lambda_{em}=560$ nm, Collins J.S. *et al.* (1981)).

Le fait que les "ghosts" traités à la glutaraldéhyde soient ingérés par microphagocytose, alors que les érythrocytes sont ingérés par phagocytose classique, peut être attribué à la perte du contenu en hémoglobine des "ghosts". Cette perte a comme conséquence que la rigidité globale du "ghost" est beaucoup moins grande que celle du globule rouge correspondant puisqu'il n'y a pas ou peu de pontage de l'hémoglobine par la glutaraldéhyde. Il faut cependant noter que malgré tout, la glutaraldéhyde n'est pas sans effet sur les "ghosts". En effet Heusinkveld *et al.* (1977) ont montré que le coefficient d'élasticité μ de la membrane du "ghost" passait de $2,05 \cdot 10^{-2}$ à $3,01 \cdot 10^{-1}$ dynes/cm pour des concentrations de glutaraldéhyde variant de 0 à 0,035%. Pour les globules rouges ce coefficient μ passe de $2,2 \cdot 10^{-2}$ à 2,9 dynes/cm aux mêmes concentrations de glutaraldéhyde ce qui est 10 fois plus élevé que dans le cas des "ghosts".

iii) Conclusion de la phagocytose de "ghosts" traités à la glutaraldéhyde

Cette dernière expérience vient confirmer l'hypothèse que le mode

d'ingestion ne dépend pas d'une modification d'un récepteur membranaire du globule rouge suite au traitement à la glutaraldéhyde, mais bien de la déformabilité de la cellule cible. En effet, les "ghosts" et les érythrocytes étant traités aux mêmes concentrations de glutaraldéhyde, ceci devrait modifier dans les deux cas, de façon identique, le ou les récepteurs membranaires susceptibles d'être responsables du mode de phagocytose, et donc conduire au même mode d'ingestion des deux types de cellules.

3.4.3. Conclusion

En conclusion, ces deux dernières expériences, c'est à dire la phagocytose de mélanges de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde ainsi que l'ingestion de "ghosts" traités à la glutaraldéhyde, montrent que ce n'est pas la modification de récepteurs membranaires par le traitement à la glutaraldéhyde qui est responsable du mode de phagocytose. En conséquence, elles viennent confirmer l'hypothèse que le mode de phagocytose dépend de la déformabilité du globule rouge.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Dans l'introduction, nous avons vu que l'essentiel des études antérieures traitant du mécanisme d'attaque des cellules et des tissus par *Entamoeba histolytica* ont été centrées sur l'aspect biochimique du phénomène, alors que les aspects morphologique et mécanique ont suscité peu d'intérêt. Or ceux-ci, comme nous l'avons montré dans notre travail, ont également de l'importance.

En premier lieu, à l'aide de la souche Laredo d'*Entamoeba histolytica* nous avons mis en évidence qu'il existe deux modes de phagocytose très différents chez cette amibe.

Le premier mode d'ingestion des globules rouges par l'amibe est une phagocytose que nous avons nommée classique, en raison de sa ressemblance au schéma habituel de la phagocytose (voir introduction, figure 3). Au cours de ce processus l'amibe émet des pseudopodes qui viennent englober les globules rouges en entier ou du moins, un très gros fragment, ce qui finalement conduit à la formation de grandes vacuoles digestives peu nombreuses.

Le deuxième mode d'ingestion que nous avons mis en évidence est très

particulier. Au cours de ce processus l'amibe semble véritablement aspirer l'érythrocyte à travers un canal étroit qui s'allonge, alors que son extrémité s'arrondit pour donner naissance à une petite vacuole digestive. Le résultat de ce type de phagocytose est la constitution au sein du trophozoïte d'un très grand nombre de petites vacuoles digestives. Nous avons appelé ce type de phagocytose par succion une microphagocytose.

Contrairement aux conclusions des travaux d'Orozco *et al.* (1985), le mode de phagocytose ne dépend pas de la présence dans notre culture de différentes sous-populations d'amibes utilisant des mécanismes de phagocytose différents, puisqu'on constate que certaines amibes utilisent simultanément les deux modes d'ingestion (figures 26 et 27).

L'utilisation de globules rouges rigidifiés par des concentrations croissantes de glutaraldéhyde montre qu'il y a une corrélation entre le mode de phagocytose observé et la déformabilité des cellules cibles, c'est-à-dire moins les érythrocytes sont déformables plus ils sont ingérés par phagocytose classique (figure 28).

La phagocytose de mélanges de globules rouges traités à différentes concentrations de glutaraldéhyde (figure 34) ainsi que de "ghosts" traités à la glutaraldéhyde (figure 37) démontrent de façon non équivoque que ce n'est pas la modification d'un récepteur membranaire consécutive au traitement à la glutaraldéhyde qui détermine le mode de phagocytose observé chez l'amibe mais bien la déformabilité de l'érythrocyte. En effet si, sous l'action de la

glutaraldéhyde, il y avait eu modification d'un récepteur membranaire de l'érythrocyte responsable du mode de phagocytose observé, le traitement à la glutaraldéhyde aurait du affecter de la même manière le "ghost" et l'érythrocyte et on devrait assister à des mécanismes d'ingestion identiques des "ghosts" et des érythrocytes. Or, même à forte concentration de glutaraldéhyde, les "ghosts" sont ingérés par microphagocytose alors que les globules rouges le sont par phagocytose classique.

La microphagocytose ne semble pas être une propriété propre à *Entamoeba histolytica* puisque des mécanismes d'ingestion semblables ont été décrits chez d'autres amibes, *Dictyostelium caveatum* (Waddell D. *et al.*, 1985) et *Naegleria fowleri* (Brown T., 1979, Marciano-Cabral F.M. *et al.*, 1982, John D.T. *et al.*, 1985, Senaldi G. *et al.*, 1989).

Waddell D. *et al.* (1985) ont montré l'existence d'un tel processus chez *Dictyostelium caveatum*, qu'ils ont appelé "cell nibbling", soit le "grignotage" de la cellule. D'après eux, ce mécanisme serait une adaptation permettant à l'amibe d'ingérer des proies plus grandes qu'elle.

Naegleria fowleri, l'agent principal des encéphalites amibiennes, présente un mécanisme de phagocytose très semblable à celui observé chez *Entamoeba histolytica*. En effet il semble que chez cet organisme il y aurait différents modes d'ingestion suivant le type de cellule auquel l'amibe s'attaque. Brown T. (1979) décrit l'ingestion de cellules embryonnaires de souris par *Naegleria fowleri*, observée en microscopie électronique, comme

étant une trogocytose (du grec trogo: grignoter), dont l'équivalent anglais est le "cell nibbling". Par ailleurs, dans une étude portant sur la cytopathogénicité de *Naegleria fowleri* à l'égard de cellules de mammifères en culture, Marciano-Cabral *et al.* (1982) confirment les observations faites par Brown T.(1979), mais préfèrent parler d'une succion de la cellule cible par l'amibe plutôt que d'un "grignotage".

Le point qui nous intéresse le plus est le fait que l'ingestion de globules rouges par *Naegleria fowleri*, observée en microscopie optique, (Senaldi G. *et al.* 1989) ressemble énormément à la microphagocytose d'érythrocytes par *Entamoeba histolytica*, alors que l'ingestion par *Naegleria fowleri* de levures dont les dimensions sont analogues à celles de l'érythrocyte, mais dont les propriétés mécaniques, en particulier la déformabilité, sont très certainement fort différentes, ressemble à la phagocytose classique de globules rouges rigidifiés à la glutaraldéhyde observée chez *Entamoeba histolytica*. Il semble donc qu'ici aussi la rigidité de la cellule cible joue un rôle important.

Ainsi, connaissant le rôle primordial que joue la déformabilité du globule rouge au cours de la phagocytose on peut dès lors tenter d'expliquer la présence de phagocytoses intermédiaires (figures 24 et 25), et proposer un mécanisme d'ingestion de ces cellules par *Entamoeba histolytica* (figure 38). Lorsque les érythrocytes sont parfaitement déformables, les contraintes mécaniques que l'amibe est capable d'exercer sur les érythrocytes sont suffisantes pour pouvoir les déformer, ce qui se traduit par une phagocytose

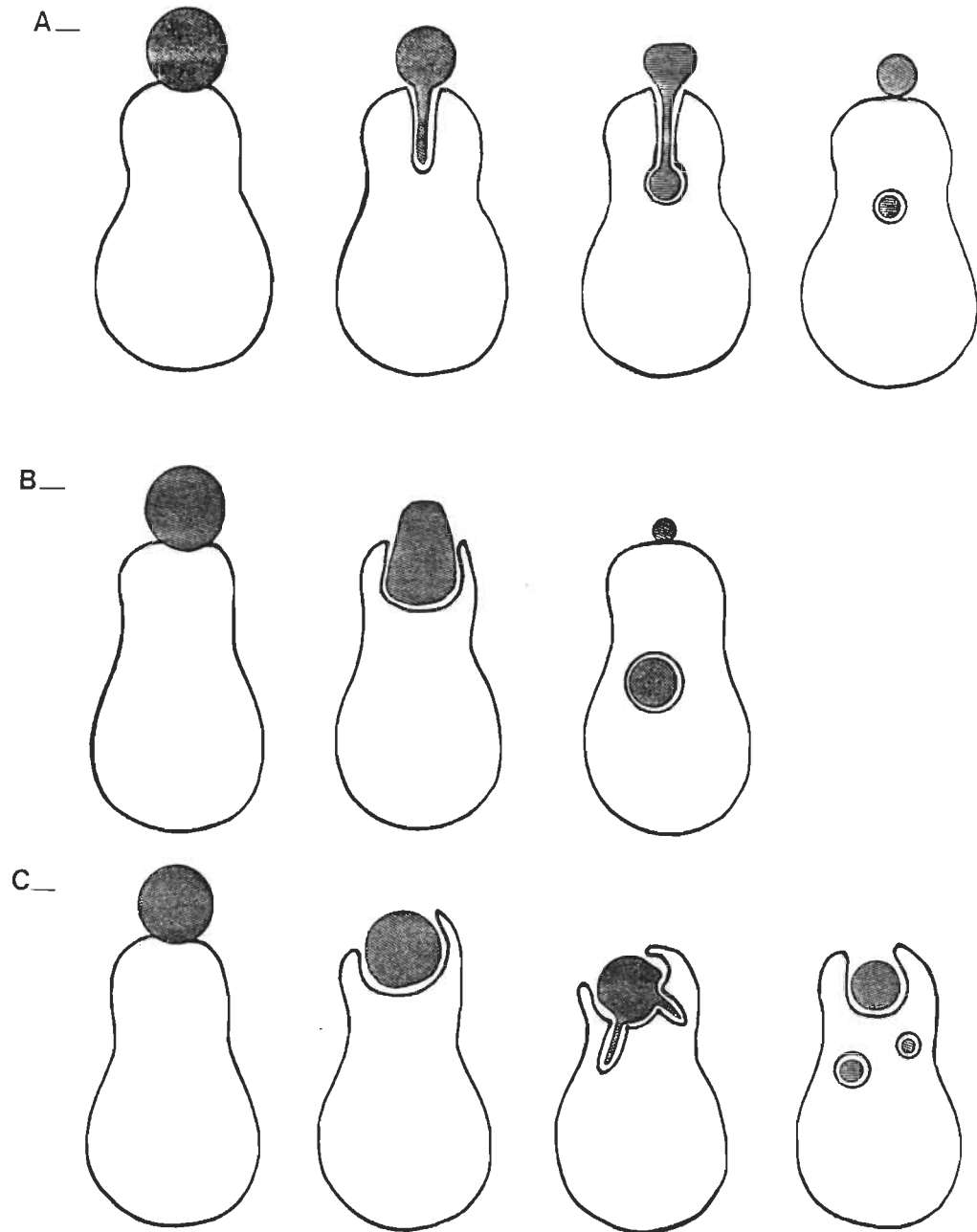


Figure 38 : Mécanisme d'ingestion de globules rouges par *Entamoeba histolytica*

- A . Microphagocytose
- B . Phagocytose classique
- C . Phagocytose intermédiaire

par succion ou microphagocytose. D'un autre côté, lorsque la rigidité de l'érythrocyte dépasse un certain seuil, l'amibe n'est plus capable de le déformer et on assiste alors à une phagocytose classique. En ce qui concerne les phagocytoses intermédiaires, une façon d'interpréter ce phénomène est la suivante: la déformabilité de l'érythrocyte n'est pas suffisamment grande pour que l'amibe puisse le déformer et l'ingérer par microphagocytose d'où, la phagocytose classique. Cependant, dans la zone de contact entre l'amibe et la cellule cible la machinerie enzymatique de l'amibe commencera à dégrader la membrane de l'érythrocyte. Ceci aurait pour effet de diminuer la rigidité de la membrane de l'érythrocyte dans cette zone permettant ainsi à l'amibe de déformer cette portion de la membrane de l'érythrocyte, d'où l'aspect de microphagocytose (figures 24 et 25).

Il faut cependant noter qu'un bon nombre de molécules qui semblent jouer un rôle important dans le processus de cytolysse de la cellule cible et qui, de plus, sont apparemment associées à la plus ou moins grande virulence des souches d'*Entamoeba histolytica* sont absentes de la souche Laredo, ou en tout cas, présentes en quantités beaucoup plus faibles que dans les souches pathogènes. En effet, la souche Laredo a une activité protéinase neutre moins élevée que celle des souches pathogènes (Lushbaugh W.B. *et al.* 1984), elle ne possède pas de collagénase (Munoz M.L. *et al.* 1984), ne dégrade pas la fibronectine (Tamalas-Rohana P. *et al.* 1988), et finalement ne possède ni hémolysine ni amoebapore (Keller F. *et al.* 1988). Ceci n'exclut cependant pas la possibilité que la souche Laredo puisse malgré tout posséder un outillage enzymatique suffisant qui lui permet de dégrader la membrane du

globule rouge et ainsi en réduire la rigidité.

Cette étude biophysique du mécanisme de la phagocytose chez *Entamoeba histolytica* vient compléter les connaissances déjà acquises sur le mécanisme d'attaque des cellules par l'amibe. En particulier, elle montre que la déformabilité ou la rigidité de la cellule cible ne constitue pas un obstacle pour cet organisme puisqu'il est capable d'ajuster son mode d'ingestion en fonction des propriétés mécaniques de la cellule cible. Ceci nous conduit à soulever la question suivante: toutes les souches d'*Entamoeba histolytica*, quelle que soit leur virulence répondent-elles de la même façon à la rigidité de la cellule cible? En d'autres termes, les souches virulentes ne sont-elles pas capables d'ingérer par microphagocytose des cellules plus rigides que les souches moins virulentes, voire non pathogènes? Si tel était le cas, cela traduirait le fait que les souches pathogènes seraient capables d'exercer des contraintes mécaniques plus grandes que les autres souches, ce qui pourrait expliquer en partie leur très grande voracité et leur grande capacité à détruire les tissus.

Cette hypothèse découle de l'analyse des travaux de Gicquaud C. (1978), d'une part, et de Smith *et al.* (1982), d'autre part. Ces deux équipes ont mesuré la force d'*Entamoeba histolytica* et trouvent des valeurs fort différentes. En effet la valeur obtenue par Smith *et al.* (1982) est environ 2000 fois plus élevée que celle mesurée par Gicquaud C. (1978). Ce très grand écart peut être imputable à plusieurs facteurs. Tout d'abord, tel que le soulignent Smith *et al.* (1982), la technique employée par les deux équipes est différente.

De plus, Gicquaud C.(1978) à utilisé la souche Laredo qui croît à 25⁰C, alors que Smith *et al.* (1982) ont pris la souche IP-106 qui est cultivée à 37⁰C. D'après ces derniers auteurs, ce facteur température pourrait également être responsable de la différence observée. Il est certain que nous ne pouvons rejeter ces deux facteurs, mais sont ils les seuls? En effet ne pourrait-on pas attribuer ce grand écart des valeurs à un facteur supplémentaire: la souche. En effet, Smith *et al.* (1982) ont fait leur mesure avec une vraie *Entamoeba histolytica* alors que Gicquaud C.(1978) a pris une *Entamoeba histolytica* - like qui est non pathogène. Or, ces souches sont-elles capables d'exercer les même contraintes mécaniques?

Pour vérifier ce point il serait possible de faire des comptages des différents modes de phagocytose de globules rouges traités à des concentrations croissantes de glutaraldéhyde, et ainsi voir si les courbes obtenues pour des souches de diverses virulences se superposent ou non. On pourrait ainsi facilement comparer entre elles les différentes souches, et ainsi voir s'il est possible d'établir une corrélation entre la virulence de la souche et les contraintes mécaniques (les forces) qu'elle exerce. Quelque soit le résultat on obtiendrait des informations quand au rôle que tiennent les processus physiques qui ont cours lors de la phagocytose chez *Entamoeba histolytica* .

BIBLIOGRAPHIE

- Aley, S.B., Cohn, Z.A., Scott, W.A., "Endocytosis in *Entamoeba histolytica* : Evidence for a unique non-acidified compartment.", J. Exp. Med., 1984, 160, 725-737.
- Araiso, T., Shindo, Y., Arai, T., Nitta, J., Kikuchi, Y., Kikiuchi, Y., Koyama, T., "Viscosity and order in erythrocyte membranes studied with nanosecond fluorometry.", Biorheology, 1986, 23, 467-483.
- Arroyo, R., Orozco, E., "Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin.", Mol. Biochem. Parasitol., 1987, 23, 151-158.
- Bailey, G.B., Day, D.B., Gasque, J.W., "Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells.", J. Exp. Med., 1985, 162, 546-558.
- Bird, R.G., McCaul, T.F., "The rhabdovirus of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens* .", Ann. Trop. Med. Parasitol., 1976, 70, 81-93.
- Brown, T., "Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures .", J. Med. Microbiol., 1979, 12, 363-371.

- Chabanel, A., Abbot, R.E., Chien, S., Schachter, D., "Effect of benzyl alcohol on erythrocyte shape, membrane hemileaflet fluidity and membrane viscoelasticity.", Biochim. Biophys. Acta., 1985, **816**, 142-152.
- Chassis, J. A., Shohet, S.B., "Red cell biochemical anatomy and membrane properties.", Annu. Rev. Physiol., 1987, **49**, 237-248.
- Cheng Yee Low, Maegraith F., "Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* in culture.", Ann. Trop. Med. Parasitol., 1970, **64**, 283-291.
- Chevez, A., Iturbe-Alessio, I., Segura, M. Corona D, "Fagocytosis de eritrocitos humanos por *Entamoeba histolytica* .", Arch. inv. Med. (Mex), 1972, **3**, (Suppl. 2), 275-286.
- Chevez, A., Segura, M., "Interacion entre los trofozoitos de *E. histolytica* y los leucocitos de varias especies animales.", Arch. Inv. Med. (Mex), 1974, **5**, (suppl. 2), 373-382.
- Chevez, A., Segura, M., Diaz, J., Sepulveda, J., "Actividad eritrofagica de los trofozoitos de *E. histolytica* sobre les hematies de diferentes especies animales.", Arch. Inv. Med. (Mex), 1974, **5**, (suppl. 2), 365-372.
- Chien, S., Dellenback, R.J., Usami, S., Seaman, G.V.F., Gregersen, M.I., "Centrifugal packing of suspensions of erythrocytes hardened with acetaldehyde.", Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, **127**, 982-985.
- Chien, S., "Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability.", Blood cells, 1977, **3**, 71-99.
- Chien, S., Schmalzer, E.A., Lee, M.M.L., Impelluso, T., Skalak, R., "Role of white blood cells in filtration of blood cell suspensions.", Biorheology, 1983, **20**, 11-27.

- Chien, S., "Red cell deformability and its relevance to blood flow.", Annu. Rev. Physiol., 1987, **49**, 177-192.
- Collins, J.S., Goldsmith, T.H., "Spectral properties of fluorescence induced by glutaraldehyde fixation.", J. Histochem. Cytochem., 1981, **29**, 411-414.
- Corry, W.D., Meiselman, H.J., "Modification of erythrocyte physicochemical properties by millimolar concentrations of glutaraldehyde.", Blood Cells, 1978, **4**, 465-480.
- Deas, J.E., Miller, J.H., "Plasmalemmal modifications of *Entamoeba histolytica* in vivo.", J. Parasitol., 1977, **63**, 25-31.
- Deloach, J., Peters, S., Pinkard, O., Glew, R., Ihler, G., "Effect of glutaraldehyde treatment on enzyme loaded erythrocytes.", Biochim. Biophys. Acta, 1977, **496**, 507-515.
- Diamond, L.S., "Improved method for monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae with trypanosomatids.", J. Parasitol., 1968(a), **54**, 715-719.
- Diamond, L.S., "Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae.", J. Parasitol., 1968(b), **54**, 1047-1056.
- Dreyer, D., "Growth of a strain of *Entamoeba histolytica* at room temperature.", Tex. Rep. Biol. Med., 1961, **19**, 393-396.
- Eaton, R.D., Meerovitch, E., Costeron, J., "The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica* .", Ann. Trop. Med. Parasitol., 1970, **64**, 299-304.

- Gicquaud, C., "Technique de mesure de la force motrice de très petites cellules amiboïdes.", Rev. Can. Biol., 1978, **37**, 201-208.
- Gicquaud, C., "Etude de l'ultrastructure du noyau et de la mitose d'*Entamoeba histolytica* .", Biol. Cellulaire, 1979, **35**, 305-312.
- Gitler, C., Calef, E., Rosenberg, I., "Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica* .", Philos. Trans. R. Soc. London, Ser.B., 1984, **307**, 73-85.
- Gitler, C., Mogyoros, M., Calef, E., Roenberg, I., "Lethal recognition between *Entamoeba histolytica* , and the host tissues.", Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1985, **79**, 581-586.
- Gitler, C., Mirelman, D., "Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica* .", Ann. Rev. Microbiol., 1986, **40**, 237-261.
- Gleason, N.N., Goldman, M., Carver, R.K., "Size and nuclear morphology of *Entamoeba histolytica* , and *Entamoeba hartmanni* .", Exp. Parasitol., 1960, **10**, 366-388.
- Gleason, N.N., Goldman, M., Carver, R.K., "Size and nuclear morphology of *Entamoeba histolytica* , and *Entamoeba hartmanni* trophozoites in cultures and in man.", Am. J. Hyg., 1963, **77**, 1-14.
- Grover, N.B., Naaman, J., Ben-Sasson, S., Doljanski, F., "Electrical sizing of particles in suspensions. I. Theory.", Biophys. J., 1969 a, **9**, 1398-1414.
- Grover, N.B., Naaman, J., Ben-Sasson, S., Doljanski, F., Nadav, E., "Electrical sizing of particles in suspensions. II. Experiments with rigid spheres.", Biophys. J., 1969 b, **9**, 1415-1425.

- Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sullivan, H.A., Mandell, G.L., "Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils.", **J. Infect. Dis.**, 1981, **143**, 83-93.
- Heusinkveld, R.S., Goldstein, D.A., Weed, R.I., Lacelle, P.L., "Effect of protein modification on erythrocyte membrane mechanical properties.", **Blood Cells**, 1977, **3**, 175-182.
- Ihler, G.M., Glew, R.H., Schnura, F.W., "Enzyme loading of erythrocytes.", **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 1973, **70**, 2663-2666.
- John, D.T., Cole, T.B., Bruner, R.A., "Amebostomes of *Naegleria fowleri* .", **J. Protozool.**, 1985, **32**, 12-19.
- Keller, F., Walter, C., Löhden, U., Hanke, W., Bakker-Grunwald, T., Trissl, D., "Pathogenic and non pathogenic *Entamoeba* : Pore formation and hemolytic activity.", **J. Protozool.**, 1988, **35**, 359-365.
- Keller, F., Hanke, W., Trissl, D., Bakker-Grunwald, T., "Pore forming protein from *Entamoeba histolytica* forms voltage and pH-controlled multi-state channels with properties similar to those of the barrel-stave aggregates.", **Biochim. Biophys. Acta.**, 1989, **982**, 89-93.
- Knight, R., Bird, R., McCaul, T., "Fine structural changes at *Entamoeba histolytica* rabbit kidney cell (RK 13) interface.", **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 1975, **64**, 197-208.
- Kobiler, D., Mirelman, D., "Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites.", **Infect. Immun.**, 1980, **29**, 221-225.
- Kobiler, D., Mirelman, D., "Adhesion of trophozoites to monolayers of human cells.", **J. Infect. Dis.**, 1981(a), **144**, 539-546.

- Kobiler, D., Mirelman, D., Mattern, C.F., "Lectin and toxin-like activities of *Entamoeba histolytica* : Comparison of properties.", Am. J. Med. Hyg., 1981(b), 30, 955-959.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., Sommers, H.M., Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology, Philadelphia: Lippincott, 1983, 578-581.
- Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy., New-York and London: Plenum Press, 1983
- Leblond, P.F., Coulomb, L., "The measurement of erythrocyte deformability using micropore membranes (A sensitive technique with clinical application).", J.Lab. Clin. Med., 1979, 94, 133-143.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R.III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G.A., "A newly revised classification of the protozoa.", J. Protozool., 1980, 27, 37-58.
- Long-Krug, S.A., Hysmith, R.M., Fisher, K.J., Ravdin, J.I., "Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica* : Description and cellular localization.", J. Infect. Dis., 1985, 152, 536-541.
- Lopez-Revilla, R., Cano-Mancera, R., "Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes.", Infect. Immun., 1982, 37, 281-285.
- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., Kairalla, A.A., Cantey, J.R., Pittman, F.E., "Relationship of cytotoxins of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* to virulence.", Gastroenterology, 1984, 86, 1488-1495.

- Lushbaugh, W.B., Miller, J.H., "The morphology of *Entamoeba histolytica* " In Ravdin, J.I., (Ed), **Amebiasis: Human Infection By *Entamoeba histolytica***, New-York: John Wiley and Son Inc., 1988, pp. 41-78.
- Lynch, E.C., Rosenberg, I.M., Gitler, C., "An ion channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica* .", **EMBO J.**, 1982, **1**, 801-804.
- Marciano-Cabral, F.M., Patterson, M., John D.T., Bradley, S.G., "Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures.", **J. Parasitol.**, 1982, **68**, 1110-1116.
- Martinez-Palomo, A., Gonzalez-Robles, A., Chavez de Ramirez, D., "Estructura ultramicroscopica de varias cepas de *Entamoeba* .", **Conferencia internacional de amebiasis**, Sepulveda, B., Diamond, L.S. (eds), (IMSS), Mex, 1976, 215-225.
- Martinez-Palomo, A., **The biology of *E. histolytica*** , Research studies press, New-York: John Wiley and Sons, 1982.
- Martinez-Palomo, A., Gonzalez-Robles, A., Chavez, B., Orozco, E., Fernandez-Costelo, S., Cervantes, A., "Structural base of the cytolytic mechanism of *Entamoeba histolytica*..", **J. Protozool.**, 1985, **32**, 166-175.
- Martinez-Palomo, A., Biology of *Entamoeba histolytica* .In A. Martinez-Palomo (Ed.), **Amebiasis**. Amsterdam: Elsevier, 1986, pp. 11-43.
- Martinez-Palomo, A., "Amoebiasis.", **Infect. Dis.**, 1988 (a), **1**, 690-694.
- Martinez-Palomo, A., "The biology of parasitism. ", Ed: Alan R. Liss, Inc., **"Biology of Amebiasis: Progress and perspectives"**, 1988 (b), pp. 61-76.

- Mel, H.C., Yee, J.P., "Modification of erythrocyte physicochemical properties by millimolar concentrations of glutaraldehyde. Corry, W.D., Meiselman, H.J.: A commentary." **Blood Cells**, 1978, **4**, 481-483.
- Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A., "Acidification of the exocytic pathways.", **Annu. Rev. Biochem.**, 1986, **55**, 663-700.
- Meza, I., Cazares, F., Rosales-Encina, J.L., Tamalas-Rohana, P., Rojkind, M., "Use of antibodies to characterize a 220 kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica* .", **J. Infect. Dis.**, 1987, **156**, 798-805.
- Mora-Galindo, J., Martinez-Palomo, A., Chavez, B., "Interaccion entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. ", **Arch. Inv. Med. (Mex)**, 1978, **9**, (Suppl. 1), 261-274.
- Mora-Galindo, J., Martinez-Palomo, A., Chavez, B., "Interaccion entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. Estudio cuantitativo", **Arch. Inv. Med. (Mex)**, 1982, **13**, (Suppl. 3), 233-243.
- Morel, F.M.M., Baker, R.F., Waykand, H., "Quantitation of human red blood cell fixation by glutaraldehyde.", **J. Cell Biol.**, 1971, **48**, 91-100.
- Muñoz, M.L., Calderon, J., Rojkind, M., "The collagenase of *Entamoeba histolytica*.", **J. Exp. Med.**, 1982, **155**, 42-51.
- Muñoz, M.L., Rojkind, M., Calderon, J., Tanimoto, M., Arias-Negrete, S., Martinez-Palomo, A., " *Entamoeba histolytica* : Collagenolytic activity and virulence.", **J. Protozool.**, 1984, **31**, 468-470.
- McCaul, T.F., "Transmission electron-microscopy observations of phagocytosis in trophozoites of *Entamoeba histolytica* in contact with tissues, culture cells.", **Z. Parasitenkd.**, 1977 (a), **52**, 203-211.

- McCaul, T.F., Bird, R.G., "Surface features of *Entamoeba histolytica* and rabbit kidney (RK13) cell surface changes after trophozoites contact. Observations by scanning electron microscopy.", **Int. J. Parasitol.**, 1977 (b), **7**, 383-388.
- McGowan, K., Deneke, C.F., Thorne, G.M., Gorbach, S.I., "*Entamoeba histolytica* cytotoxin: Purification, characterization, strain virulence, and protease activity.", **J. Infect. Dis.**, 1982, **146**, 616-625.
- McLaughlin, J., Faubert, G., "Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica* .", **Can J. Microbiol.**, 1977, **23**, 420-425.
- McLaughlin, J., Aley, S., "The biochemistry and functional morphology of *Entamoeba* .", **J. Protozool.**, 1985, **2**, 221-240.
- Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Davis, C., Quintana, N., "Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy.", **J. Histochem.Cytochem.**, 1972, **20**, 1006-1023.
- Orozco, E., Martinez-Palomo, A., Guarneros, G., Kobiler, D., Mirelman, D., "Receptores participantes en la adherencia de *E. histolytica* a eritrocitos humanos.", **Arch. Invest. Med. (Mex.)**, 1982, **13**, (Suppl 3), 177-183.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., Sanchez, T., "*Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulent factor.", **J. Exp. Med.**, 1983, **158**, 1511-1521.
- Orozco, E., Suarez, M., Sanchez, T., "Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica* , strain HM1:IMSS.", **Int. J. Parasitol.**, 1985, **15**, 665-668.

- Petri, W.A., Ravdin, J.I., "Parasitic infections in the compromised host." In Walzer, P.D. Genta, R.M. (Eds), *Entamoeba histolytica*, New York, Basel, Dekker M., Inc., 1989, 385-437.
- Petri, W.A., Smith, R.D., Schlesinger, P.H., Murphy, C.F., Ravdin, J.I., "Isolation of the galactose binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* .", *J. Clin Invest.*, 1987, **80**, 1238-1244.
- Ravdin, J.I., Croft, B.Y., Guerrant, R.L., "Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica* .", *J. Exp. Med.*, 1980, **152**, 377-390.
- Ravdin, J.I., Guerrant, R.L., "Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica* .", *J. Clin. Invest.*, 1981, **68**, 1305-1313.
- Ravdin, J.I., Guerrant, R.L., "A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis.", *Rev. Infect. Dis.*, 1982, **4**, 1185-1207.
- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L., Long-Krug, S.A., "Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*.", *J. Infect. Dis.*, 1985, **152**, 542-549.
- Ravdin, J.I., Moreau, F., Sullivan, J.A., Petri, W.A., Mandell, G.L., "Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica* ", *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 1505-1512.
- Ravdin, J.I., "*Entamoeba histolytica* : From adherence to enteropathy.", *J. Infect. Dis.*, 1989, **159**, 420-429.

- Reeves, R.E., "Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903.", Adv. Parasitol., 1984, 32, 105-142.
- Reinhart, W.A., Usami, S., Schmalzer, E.A., Lee, M.M.L., Chien, S., "Evaluation of red blood cell filterability test: Influences of pore size, hematocrit level, and flow rate.", J. Lab. Clin. Med., 1984, 104, 501-516.
- Reynolds, S., "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in microscopy.", J. Cell Biol., 1963, 17, 208-212.
- Richards, C.S., Goldman, M., Cannon, L.T., "Cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba histolytica*-like strains at reduced temperature.", Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966, 15, 648-655.
- Rosales-Encina, J.L., Meza, I., Lopez de Leon, A., Tamalas-Rohana, P., Rojkind, M., "Isolation of a 220 kDa protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica* .", J. Infect. Dis., 1987, 156, 790-797.
- Rosenberg, I., Gitler, C., "Subcellular fractionation of amoebapore and plasma membrane components of *Entamoeba histolytica* using self generating percoll gradients.", Mol. Biochem. Parasitol., 1985, 14, 231-243.
- Rosenberg, I., Bach, D., Loew, L.M., Gitler, C., "Isolation, characterization and partial purification of transferable membrane channel (amoebapore) produced by *Entamoeba histolytica* .", Mol. Biochem. Parasitol., 1989, 33, 237-248.

- Sargeaunt, P.G., Williams, J.E., Neal, R.A., "A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK9 etc...)," *E. histolytica-like* and other morphologically identical amoeba using isoenzyme electrophoresis.", Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, **74**, 469-474.
- Sargeaunt, P.G., Jackson, T. F. H. G., Simjee, A., "Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates especially those from liver abscesses.", Lancet, 1982, **i**, 1386-1388.
- Sargeaunt, P. G., Wiffen, S., Bhojnani, R., Williams, J. E., Jackson, T. F. H. G., Felmingham, D., Goldmeier, D., Allanson-Jones, E., Mindel, A., Phillips, E., "The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis." Arch. Invest. Med. (Mex.), 1987, **18**, 69-75.
- Schachter, D., Cogan, U., Abbott, R.E., "Asymmetry of lipid dynamics in human erythrocyte membranes studied with permeant fluorophores.", Biochem., 1982, **21**, 2146-2150.
- Schmalzer, E.A., Skalak, R., Usami, S., Vayo, M., Chien, S., "Influence of red cell concentration on filtration of blood cell suspensions.", Biorheology, 1983, **20**, 29-40.
- Schulte, W., Scholze, H., "Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix.", J. Protozool., 1989, **36**, 538-543.
- Senaldi, G., Strosselli, M., Di Perri, G., Parisi, A., Scaglia, M., Rondanelli, E.G., "*Naegleria fowleri* : Phase contrast cinematographic study of phagocytosis of human erythrocytes.", Exp. Parasitol., 1989, **69**, 290-293.
- Sepulveda, B., "Progress in amebiasis.", Scand. J. Gastroenterol., 1982, **17**, 153-164.

- Shinitzky, M., Barenholz, Y., "Fluidity parameters of lipid regions determinated by fluorescence polarization.", Biochim. Biophys. Acta., 1978, 515, 367-394.
- Silverstein, S.C., Steinman, R.M., Cohn, Z.A., "Endocytosis.", Ann. Rev. Biochem., 1977, 46, 669-722.
- Skalak, R., Impelluso, T., Schmalzer, E.A., Chien, S., "Theoretical modeling of filtration of blood cell suspensions.", Biorheology, 1983, 20, 41-56.
- Smith, J.M., Meeroovitch, E., "*Entamoeba histolytica* : The dynamics of penetrating a meniscus.", Can. J. Zool., 1982, 60, 2124-2128.
- Spurr, A., "A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.", J. Ultrastruct. Res., 1969, 26, 31-43.
- Stoltz, J.F., Donner, M., "Fluorescence polarization applied to cellular microrheology.", Biorheology, 1985, 22, 227-247.
- Tamalas-Rohana, P., Meza, I., "Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: Substrate degradation and changes in cytoskeleton organization.", J. Cell Biol., 1988, 106, 1787-1794.
- Thorpe, N.O., "Cell Biology.", New-York: J. Wiley and Sons, 1984, Endocytosis, 248-274.
- Treviño-Garcia, N., Feria-Velasco, A., Ruiz de Chavez, I. "Eritrofagocitosis por *Entamoeba histolytica* .", Arch. Invest. Med (Mex), 1972, 3, (Suppl.2), 295-302.

- Treviño-Garcia, N., Castaneda, M., Gonzales Angulo, A., "Comparacion entre los trofozoitos de *E. histolytica* procedentes de portadores asintomaticos y los obtenidos de pacientes con lecciones amibianas.", **Arch. Invest. Med (Mex).**, 1973 (a), **4**, (Suppl.1), 517-523.
- Treviño-Garcia, N., Castaneda, M., Magdaleno, V., Feria velasco, A., "Eritrofagia y leucofagia por trofozoites de *E. histolytica* procedentes de portadores asintomaticos y obtenidos de pacientes con lesiones amibianas.", **Arch. Invest. Med (Mex).**, 1973 (b), **4**, (Suppl.1), 549-557.
- Treviño-Garcia, N., Castaneda, M., Tanimotoweki, M., "Probable mecanismo de accion de *E. histolytica* en el higado del hamster. Estudio submicroscopico.", **Arch. Invest. Med (Mex).**, 1974, **5**, (Suppl. 2), 393-402.
- Trissl, D., Martinez-Palomo, A., "Surface properties of *Entamoeba* : Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains.", **J. Exp. Med.**, 1978 (a), **148**, 1137-1145.
- Trissl, D., Martinez-Palomo, A., De la Torre, M., Perez de Suarez, E., "Fagocitosis de eritrocitos humanos por *Entamoeba histolytica* . Estudio cuantitativo.", **Arch. Invest. Med (Mex).**, 1978 (b), **9**, (Suppl. 1), 219-222.
- Vann Bennett, "The membrane skeleton of human erythrocytes and its implication for more complex cells.", **Ann. Rev. Biochem.**, 1985, **54**, 273-304.
- Vann Bennett, "The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeleton.", **Biochim. Biophys. Acta.**, 1989, **988**, 107-121.
- Waddell, D.R., Vogel, G., "Phagocytic behavior of the predatory slime mold, *Dictyostelium caveatum* .", **Exp. Cell Res.**, 1985, **159**, 323-334.

- Walsh, J., "Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality.", Rev. Infect. Dis., 1986, **8**, 228-238.
- Yee, J.P., Mel, H.C., "Kinetics of glutaraldehyde fixation of erythrocytes: Size, deformability, form, osmotic properties.", Blood Cells, 1978, **4**, 485-497.
- Young, J.D.E., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.C., Cohn, Z.A., "Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica* .", J. Exp. Med., 1982, **156**, 1677-1690.
- Zaman, V., "Ingestion of erythrocytes by *Entamoeba* ." Acta Trop., 1970, **27**, 177-183.